

**ZUM MECHANISMUS DER FERRIHÄMOGLOBIN - BILDUNG
DURCH N - ARYLHYDROXYLAMINE UND
N - ARYLACETOHYDROXAMSÄUREN**

MICHAEL RIEDL

1987



ZUM MECHANISMUS DER FERRIÄMOGLOBIN-BILDUNG DURCH
N-ARYLHYDROXYLAMINE UND N-ARYLACETOHYDROXAMSÄUREN

Dissertation

der

Fakultät für Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Michael Riedl

aus München

1987

Dissertation eingereicht am 16.6.1987

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Lenk

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.7.1987

Herrn Prof. Dr. W. Lenk, meinem Doktorvater, danke ich sehr herzlich für die Vielzahl von Anregungen bei der Planung und Deutung der Experimente und für seine stets bereitwillige Vermittlung von theoretischem und praktischem Fachwissen.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Hartmann vom Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, der die Durchführung dieser Arbeit als Fachvertreter der Fakultät für Chemie und Pharmazie unterstützte.

Frau I. Buhrow und Herrn Prof. Dr. W. Schäfer vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Frau G. Schild und Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler vom Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried bei München, danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Frau C. Frenzel und Herrn Prof. Dr. E. Lengfelder vom Strahlenbiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für die Durchführung der Radiolyse-Experimente.

Herrn Dipl. Chem. M. Drees und Herrn Priv. Doz. Dr. K. Beyer vom Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München, danke ich für ihre Unterstützung bei der Aufnahme der ESR-Spektren.

Frau R. Heilmair danke ich für ihre unermüdliche Mitwirkung bei der Präparation von Hämoglobin.

ZUSAMMENFASSUNG	1
EINLEITUNG	6
MATERIAL	10
1. Chemikalien	10
2. Biochemika	11
3. Biologisches Material	11
4. Geräte	12
METHODEN	13
1. Gereinigtes Human-Hämoglobin	13
2. Ferrihämoglobin	14
3. Desoxyhämoglobin	14
4. Rindererythrozyten-Hämolysat	14
5. Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin-Lösungen und Ermittlung des Ferrihämoglobingehaltes	15
6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie	15
7. Dünnschichtchromatographie	16
8. Messung von gelöstem Sauerstoff	17
9. Bestimmung von H_2O_2	19
10. ESR-Spektroskopie	19
11. Radiolyse-Experimente	20
12. Bestimmung von pK_a -Werten	22
ERGEBNISSE	23
1. Versuche zur Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin	23
1.1. Zeitabhängige Analyse der Reaktionsprodukte	23
1.2. Kinetik der Sauerstoffaufnahme	26
1.3. Die Bedeutung von H_2O_2 und $O_2^{\cdot -}$	27

2. Versuche mit gereinigtem Human-Hämoglobin und N-Hydroxy-4-chloranilin	28
2.1. Oxyhämoglobin	28
2.1.1. Reaktionsprodukte	30
2.1.2. Veränderung der O_2 -Konzentration	31
2.1.3. Ferrihämoglobin-Bildung	32
2.1.4. Folgereaktionen	32
2.1.5. Bildung und Zerfall von 4-Chlorphenylnitroxid	33
2.1.6. Einfluß von Katalase und Superoxid-Dismutase	34
2.1.7. Veränderung der O_2 -Konzentration in Abhängigkeit vom Verhältnis HbO_2 zu N-Hydroxy-4-chloranilin	34
2.2. Die hämoglobinkatalysierte Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin	37
2.2.1. Veränderung der O_2 -Konzentration	37
2.2.2. Spektroskopische Befunde	38
2.2.3. Einfluß von Katalase	40
3. Versuche zur chemischen Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	40
3.1. Oxidation mit Bleidioxid in Benzol	41
3.2. Oxidation mit Bleidioxid in Wasser	42
3.2.1. Reaktionsprodukte	42
3.2.2. Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters	45
3.3. Die Reaktion mit KO_2 in Dimethylsulfoxid	47
3.4. Die Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	47
3.5. Der Zerfall von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Diethylether	48
3.6. Die Reaktion mit radiolytisch erzeugten Radikalen	52

4. Versuche mit Oxyhämoglobin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid	53
4.1. Zeitabhängige Analyse der Reaktionsprodukte	53
4.2. Spektroskopische Befunde	59
4.3. Die Bedeutung von H_2O_2 und $O_2^{\pm}$	60
4.4. ESR-Spektroskopie	60
4.5. Versuche mit Rindererythrozyten-Hämolysat	61
5. Versuche mit HbO_2 und anderen N-Arylaceto hydroxamsäuren	62
6. pK_a -Werte verschiedener N-Arylaceto hydroxamsäuren	64
7. Versuche mit Ferrihämoglobin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid	65
7.1. Reaktionsprodukte	65
7.2. Die Reduktion von Ferrihämoglobin	66
7.3. Sauerstoffaufnahme	66
7.4. Der Einfluß von H_2O_2	67
DISKUSSION	68
1. Die Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin	68
2. Die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit HbO_2	72
3. Die hämoglobinkatalysierte Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin	78
4. Autoxidation und chemische Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid	79
5. Die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit HbO_2	85

6. Vergleich der Mechanismen der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chlor- acetanilid	89
--	----

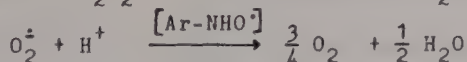
LITERATURVERZEICHNIS	92
----------------------	----

ABKÜRZUNGEN	100
-------------	-----

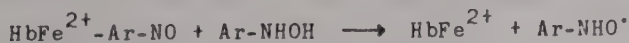
ZUSAMMENFASSUNG

Der Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylhydroxylamine und N-Arylaceto hydroxamsäuren wurde am Beispiel von N-Hydroxy-4-chloranilin (N-OH-4ClA) und N-Hydroxy-4-chloracetanilid (N-OH-4ClAA) untersucht. Um weitere Hinweise auf den Reaktionsablauf zu erhalten, wurde auch die Autoxidation der beiden Verbindungen sowie die chemische Oxidation von N-OH-4ClAA untersucht.

Eine äquimolare Menge des Arylhydroxylamins reagierte mit gereinigtem Oxyhämoglobin bei 25°C sehr schnell unter Bildung von 50% Ferrihämoglobin und 50% des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes. Auf Grund der O₂-Freisetzung, der Kinetik, dem Vergleich mit der Autoxidation von N-OH-4ClA und anderen Befunden werden für den Mechanismus der gekoppelten Oxidation folgende Reaktionen vorgeschlagen:

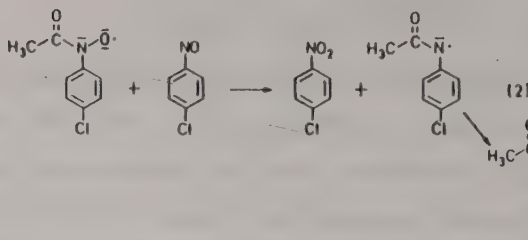
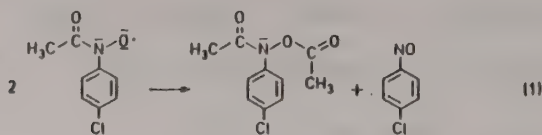


Im Anschluß an die gekoppelte Oxidation wurde der Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex unter O₂-Verbrauch wieder zersetzt, wobei zunächst etwa äquimolare Mengen Oxy- und Desoxyhämoglobin gebildet wurden, ehe eine langsame Ferrihämoglobin-Bildung begann. Für den Zerfall des Komplexes wurden u.a. folgende Reaktionen postuliert:



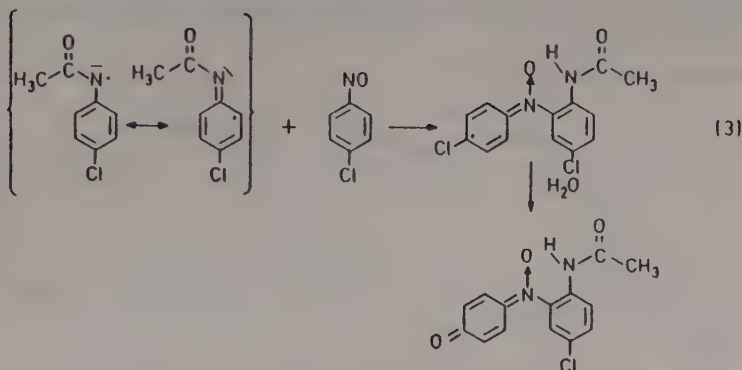
Sowohl in der raschen Anfangsphase der Reaktion als auch während des Zerfalls des Komplexes nahm die Summe der nachgewiesenen Reaktionsprodukte rasch ab, was eine kovalente Bindung an Hämoglobin wahrscheinlich macht. Dabei ergaben sich Hinweise, daß nicht das Arylhydroxylamin selbst, sondern vor allem sein Oxidationsprodukt, das Nitrosoaren an Hämoglobin gebunden wird.

Bei der Oxidation von N-OH-4ClAA mit PbO_2 in Benzol wurde N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid erhalten, das mit Hilfe der ESR- und UV-Spektroskopie nachgewiesen wurde und nach einer Kinetik 2. Ordnung zerfiel (Riedl, 1983). Sowohl bei der Oxidation in Benzol als auch bei der Oxidation in H_2O wurden 4-Chlornitrosobenzol, 4-Chlornitrobenzol, 4-Chloracetanilid und N-Acetoxy-4-chloracetanilid gefunden. Hieraus kann man schließen, daß das Nitroxid in beiden Lösungsmitteln gebildet wird und nach einem von Forrester et al. (1970) formulierten Mechanismus zerfällt:

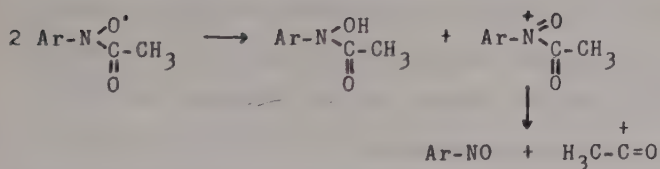


Weitere Hinweise auf diesen Zerfallsmechanismus ergaben sich aus der Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters sowie aus der Bildung von N-(2-Acetyl-amino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid. Vermutlich reagiert das N-Acetylaminyl,

das durch Reaktion (2) entsteht, in folgender Weise mit 4-Chlor-nitrosobenzol:



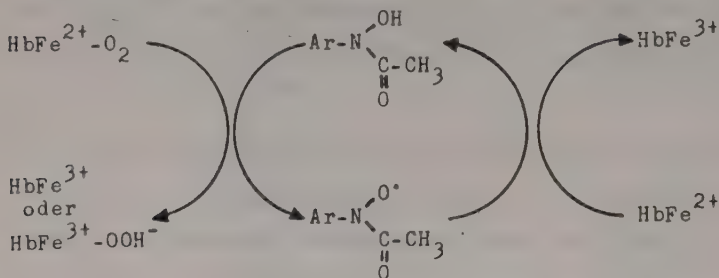
Da auch bei der Autoxidation von N-OH-4ClAA alle vier Endprodukte der Reaktionen (1) und (2) gefunden wurden, muß auch in diesem Falle die Beteiligung des Nitroxids angenommen werden. Im Gegensatz zur Oxidation in Benzol und H_2O wurde in Diethylether eine Disproportionierung des Nitroxids beobachtet:



Bei der Reaktion von N-OH-4ClAA mit gereinigtem Oxyhämoglobin wurde, verglichen mit der Ferrihämoglobin-Bildung, nur eine geringe Umwandlung der Hydroxamsäure beobachtet, was den katalytischen Charakter der Reaktion erkennen ließ. Im Gegensatz zur Reaktion mit N-OH-4ClA, bei der das ESR-Spektrum des primären Nitroxids beobachtet wurde, konnte mit N-OH-4ClAA das sekundäre Nitroxid nicht direkt nachgewiesen werden. Da bei der Reaktion mit Hämoglobin jedoch die Endprodukte der Reaktionen (1), (2) und (3) gebildet wurden, wird indirekt auf die

Bildung von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid geschlossen.

Als Mechanismus der katalytischen Ferrihämoglobin-Bildung wird der folgende Zyklus postuliert,



bei dem das Nitroxid als Träger der katalytischen Wirkung fungiert. Auf Grund der Kinetik 2. Ordnung (Sterzl, 1984) wird angenommen, daß die Bildung des Nitroxids die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung bestimmt. Die Reduktion des Nitroxids ist daher schneller als seine Bildung, was eine sehr niedrige stationäre Konzentration und damit das Fehlen eines ESR-Signals zur Folge haben kann. Da weder $O_2^{\cdot -}$ noch freies H_2O_2 nachgewiesen werden konnte, wurde eine vollständige Reduktion des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs in situ postuliert, wobei als kurzlebiges Zwischenprodukt der Ferrihämoglobin- H_2O_2 -Komplex (Keilin und Hartree, 1950) in Frage kommt. Dieser Komplex wird nämlich von N-OH-4ClAA unter Bildung von $HbFe^{3+}$ zersetzt.

Aus dem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten verschiedener N-Arylacetoxyhydroxamsäuren (N-Hydroxy-acetanilid, N-Hydroxy-4-ethoxy-acetanilid, N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid und N-OH-4ClAA) wurde geschlossen, daß sowohl der Chlor- als auch der Ethoxy-Substituent in para-Position des aromatischen Rings die kata-

lytische Wirkung der N-Phenyl-Hydroxamsäure verstärken kann. Ein Zusammenhang zwischen den pK_a -Werten der Hydroxamsäuren und ihrer katalytischen Aktivität wurde nicht festgestellt.

EINLEITUNG

N-Arylhydroxylamine und ihre N-Acetylderivate (N-Aryl-acetohydroxamsäuren) werden im Organismus durch enzymatische N-Hydroxylierung von primären aromatischen Aminen und Acetamiden, aber auch durch enzymatische Reduktion von Nitroaromaten gebildet (Übersicht bei Kiese, 1974).

Beide Verbindungsklassen gehören neben den Aminophenolen zu den wichtigsten Metaboliten, die für die toxischen Wirkungen von aromatischen Amino- und Nitroverbindungen verantwortlich gemacht werden. Daher sind diese Verbindungen für die Erforschung der toxischen Wirkungen von Arzneimitteln, die diese Stickstoffsubstituenten am aromatischen Ring tragen, von besonderem Interesse. So wird z.B. die N-Hydroxylierung von Phenacetin als Ursache für dessen Hämato- und Nephrotoxizität betrachtet, die nach chronischem Mißbrauch oder bei starker Überdosierung beobachtet wurde.

Die toxischen Wirkungen von N-Arylhydroxylaminen und N-Aryl-acetohydroxamsäuren sind von der Art des aromatischen Restes abhängig. Während verschiedene polyzyklische Verbindungen, wie z.B. N-Hydroxy-4-aminobiphenyl oder N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren als äußerst wirksame chemische Carcinogene bekannt sind, steht bei den monozyklischen Verbindungen vor allem die akute Toxizität im Vordergrund. Diese äußert sich z.B. in Form von dunklen Einschlüssen in den Erythrozyten, die man als Heinz-Körper bezeichnet, in einer Schädigung der Erythrozytenmembran, die zu hämolytischer Anämie führen kann sowie in der Oxidation des Blutfarbstoffs.

Der Mechanismus der Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine in vivo sowie in Erythrozyten in vitro, der 1950 von Kiese aufgeklärt wurde, stellt einen katalytischen Kreisprozess dar.

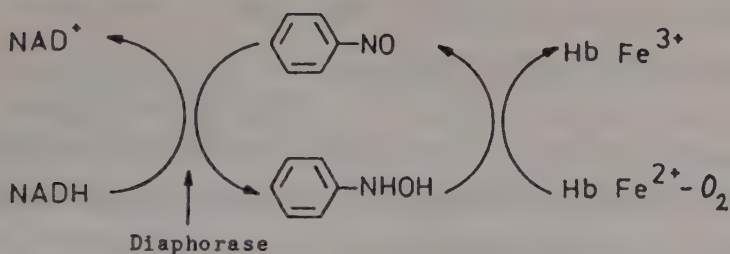


Abb. 1 Der Mechanismus der katalytischen Oxidation von Hämoglobin durch Arylhydroxylamine

In einer gekoppelten Reaktion oxidiert der Sauerstoff des Oxyhämoglobins das Arylhydroxylamin zum Nitrosoaren und das Hämoglobin zu Ferrihämoglobin. Das Nitrosoaren wird durch die Diaphorasen (Reduktasen) der Erythrozyten wieder zum ursprünglichen Arylhydroxylamin reduziert. Auf diese Weise werden pro Mol Arylhydroxylamin viele Äquivalente Hämoglobin-Eisen oxidiert, ehe der Zyklus durch die Erschöpfung der Reduktionskapazität der Erythrozyten oder auf Grund von Nebenreaktionen des Arylhydroxylamins zum Stillstand kommt. Der Mechanismus der eigentlichen Oxidationsreaktion des Hämoglobins, d.h. der Schritt der gekoppelten Oxidation ist aber bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Acetylphenylhydroxylamin wurde von Heubner et al. (1953) erstmals beschrieben. Da auch diese Verbindung eine katalytische Wirkung erkennen ließ,

wurde von Heubner et al. eine radikalische Zwischenstufe als Träger der katalytischen Aktivität postuliert. Im Gegensatz dazu schlossen Kiese und Plattig (1959) aus ihren Versuchen mit Acetylphenylhydroxylamin, daß N-Arylaceto-*hydroxamsäuren* erst nach enzymatischer Hydrolyse als katalytische Ferrihämoglobinbildner wirken.

In neueren Arbeiten von Sterzl (1984) und von Lenk und Sterzl (1986) wurde die Ferrihämoglobin-Bildung durch sechs verschiedene N-Arylaceto-*hydroxamsäuren* in vivo, in Erythrozyten in vitro sowie mit gereinigtem Hämoglobin untersucht. Dabei zeigte sich, daß in vivo das Arylhydroxylamin, als Hydrolyseprodukt der Hydroxamsäure, für einen Teil des gebildeten Ferrihämoglobins verantwortlich ist. In Erythrozyten in vitro sowie in Lösungen von gereinigtem Hämoglobin wird dagegen die eigene katalytische Aktivität der Hydroxamsäure deutlich erkennbar. In Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin wurden beispielsweise pro Mol N-Hydroxy-4-chloracetanilid in 3 h bis zu 78 Äquivalente Hämoglobin-Eisen oxidiert.

Auf Grund dieser Befunde muß ein eigenständiger Mechanismus für die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Arylaceto-*hydroxamsäuren* angenommen werden. Die bereits von Heubner (1953) aufgestellte Hypothese, nach der ein Radikal als katalytisch wirksame Zwischenstufe an der Reaktion beteiligt ist, erscheint auf der Grundlage der Ergebnisse von Lenk und Sterzl (1986) derzeit am naheliegendsten. Weiteres Gewicht erhält diese Hypothese durch die Ergebnisse von Forrester et al. (1970), die ein sekundäres Nitroxid als Zwischenstufe bei der Oxidation von N-Aryl-*aceto-*

hydroxamsäuren mit Silberoxid wahrscheinlich machen. Ein solches Nitroxid konnte auch von Bartsch et al. (1971) bei der Oxidation von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren mit Meerrettich-Peroxidase und H_2O_2 nachgewiesen werden.

Aus elektrochemischen Untersuchungen an sieben verschiedenen N-Arylaceto-hydroxamsäuren ist bekannt, daß das Redoxpotential der Einelektronen-Oxidation je nach Art des aromatischen Restes zwischen +550 und +630 mV liegt (Riedl, 1983). Das zeigt, daß auf Grund der thermodynamischen Gegebenheiten eine Oxidation von N-Arylaceto-hydroxamsäuren durch den Sauerstoff des Oxyhämoglobins tatsächlich möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von N-Arylaceto-hydroxamsäuren mit gereinigtem Hämoglobin unter dem Gesichtspunkt der Radikalhypothese untersucht. Außerdem wurde die gekoppelte Oxidation von Hämoglobin mit einem Arylhydroxylamin untersucht, um eventuelle Analogien zwischen beiden Mechanismen aufzuzeigen. Als Modellsubstanzen wurden N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid ausgewählt, da sich diese Verbindungen durch hohe katalytische Aktivität auszeichnen. Um den Reaktionsablauf zu studieren, wurden vor allem Produktmusteranalysen in zeitlicher Folge durchgeführt, wobei synchron der Gehalt an Ferrihämoglobin bestimmt und die Veränderung der Sauerstoffkonzentration in der Lösung gemessen wurde. Parallel dazu wurden chemische Modellreaktionen durchgeführt, um daraus Hinweise auf den Reaktionsablauf zu erhalten. Daher wurde z.B. die Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin sowie die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Einelektronen-Oxidationsmitteln untersucht.

MATERIAL

1. Chemikalien

N-Arylacetohydroxamsäuren

N-Hydroxyacetanilid wurde nach Bamberger (1918) durch Acetylierung von Phenylhydroxylamin mit Acetanhydrid dargestellt : Schmp. 66-67°C (Bamberger, 1918 : 67-67,5°C)

N-Hydroxyphenacetin wurde nach Fischbach (1975) aus 4-Nitrosophenetol, Acetaldehyd und Aluminiumisopropylat synthetisiert : Schmp. 103 -104°C (Fischbach, 1975 : 104°C)

N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurde nach Poirier et al. (1963) durch katalytische Hydrierung von 4-Chlor-nitrobenzol in Gegenwart von Acetanhydrid und Triethylamin dargestellt : Schmp. 111 -112°C (Kiese und Lenk, 1971 : 111 -112°C)

N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid wurde durch Acetylierung von N-Hydroxy-3,4-dichloranilin mit Thioessigsäure dargestellt : Schmp. 126 -127°C (Sterzl, 1978 : 126 -127°C)

N-Hydroxy-4-chloranilin wurde nach Haworth & Lapworth(1921) durch Reduktion von 4-Chlor-nitrobenzol mit Natriumhydrogensulfid synthetisiert : Zers. Pkt. 86 -87°C (Haworth & Lapworth, 1921 : 86,5°C)

N-Hydroxy-3,4-dichloranilin wurde aus 3,4-Dichlornitrobenzol durch katalytische Reduktion mit Hydrazin und Palladium/Aktivkohle dargestellt : Zers. Pkt. 114-117°C (Sterzl, 1978:114-117°C)

4-Chlornitrosobenzol wurde durch Oxidation von N-Hydroxy-4-Chloranilin mit Eisen(III)-chlorid dargestellt und durch Wasserdampfdestillation sowie durch Umkristallisieren aus n-Heptan bei -18°C gereinigt. Die Reinheit des Produktes wurde mit Hilfe der HPLC geprüft, wobei 0,5 % 4-Chlor-nitrobenzol gefunden wurden.

4,4-Bisazoxychlorbenzol wurde nach Gattermann und Wieland (1962) aus N-Hydroxy-4-chloranilin und Kaliumhydroxid dargestellt : Schmp. $154-155^{\circ}\text{C}$ (Heumann, 1872 : $155-156^{\circ}\text{C}$)

sonstige Chemikalien

4-Chlor-nitrobenzol, Bleidioxid, Kieselgel 60 F₂₅₄, DC-Fertigplatten und alle Lösungsmittel in p.A.- Qualität wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Diethylether wurde vor Gebrauch destilliert. Kaliumsuperoxid und Nitroblau-tetrazoliumchlorid waren Produkte der Firma Fluka (Neu-Ulm). Zur Säulenchromatographie von Hämoglobin wurden Sephadex^R G 100, G 77 und G 25 (Deutsche Pharmacia, Freiburg) und DE 52-Celulose (Whatman, Wiesbaden) verwendet.

2. Biochemika

Katalase(EC 1.11.16) wurde von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen. Superoxid-Dismutase(EC 1.15.1.1.) war ein Produkt der Firma Sigma (München).

3. Biologisches Material

Human-Erythrozyten-Konzentrat wurde (nach Ablauf der Lager-

fähigkeit) vom BRK München erhalten. Rinderblut wurde vom Schlachthof München bezogen.

4. Geräte

Elektronenspektren im sichtbaren und UV-Bereich wurden mit einem Cary 118 der Firma Varian (Palo Alto, Calif.) aufgenommen.

NMR-Spektren wurden an einem Varian HA-100 aufgenommen, Massenspektren an einem CH 7 A - Massenspektrometer von Varian.

Infrarotspektren wurden an einem Typ 325- Spektrometer von Perkin Elmer (Überlingen) aufgenommen.

ESR-Spektren wurden mit einem Gerät vom Typ EC 200- SRC der Firma Bruker (Karlsruhe) aufgezeichnet.

Zur O₂- Messung wurde eine Clark'sche Sauerstoffelektrode mit Digitalanzeige der Firma Rank Brothers (Bottisham, UK) verwendet.

Schmelzpunkte wurden mit einem Gerät nach Dr. Tottoli der Firma Büchi (Flawil, Schweiz) gemessen und korrigiert.

Zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie wurde eine Pumpe vom Typ M 510, ein Injektionssystem U 6 K und ein Zweistrahl-Detektor vom Typ M440 der Firma Waters (Milford, Mass.) verwendet. Die Trennsäulen vom Typ μ Bondapak C 18 (0,39 x 30 cm) waren ebenfalls von der Firma Waters.

Als Schreiber diente ein Servogor 2220 der Firma BBC Metrawatt (München).

METHODEN

1. Gereinigtes Human-Hämoglobin

Lösungen von gereinigtem Human-Hämoglobin wurden nach Eyer et al. (1975) aus Erythrozyten-Konzentrat hergestellt. Ca. 100 ml des Zellkonzentrats wurden fünfmal mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen, indem die Zellen jeweils abzentrifugiert (10 Min. bei 3000g) und anschließend im gleichen Volumen Puffer resuspendiert wurden. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen im 3-fachen Volumen Wasser unter Zusatz einer Spatelspitze Saponin mit Ultraschall hämolysiert. Nach dem Abzentrifugieren der Zellmembranen (20 Min. bei 18 800g) wurden 70ml des Hämolysats, das auf eine Konzentration von ca. 100g Hb/l verdünnt wurde, an Sephadex G 100 (Säule: 7 x 80cm) mit 0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 8,3 aufsteigend chromatographiert. Anschließend wurde die Hauptfraktion (ca. 1 l) absteigend (Säule: 4 x 15 cm) an DE 52-Cellulose chromatographiert und mit einem linearen Gradienten (0,01 M Tris-HCl-Puffer pH 8,3 - 0,1 M Tris-HCl pH 7,0) eluiert. Die Hauptfraktion wurde danach auf einer kleinen Säule (3 x 8 cm) an DE-52-Cellulose gebunden und mit einer 0,5 M NaCl-Lösung in 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0 desorbiert, wobei ca. 30 ml einer 10-14 %igen Lösung erhalten wurden. Vor der Verwendung der Hämoglobin-Lösung wurde diese 16 h gegen 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 dialysiert. Alle Präparationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

2. Ferrihämoglobin

Lösungen von gereinigtem Ferrihämoglobin wurden durch Oxidation von gereinigtem Human-Hämoglobin mit der 3-fachen stöchiometrischen Menge Kaliumferricyanid hergestellt. Das Oxidationsmittel wurde durch Gel-Filtration über Sephadex G 25 mit 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 als Elutionsmittel abgetrennt.

3. Desoxyhämoglobin

Über eine Lösung von gereinigtem Human-Hämoglobin wurde in einem Reaktionsgefäß, in dem die Flüssigkeit eine große Oberfläche besitzt, unter ständigem Umschwenken ca. 15 min lang ein Stickstoffstrom geleitet. Das Gaseinleitungsrohr tauchte dabei nicht unter die Oberfläche der Flüssigkeit, um eine Denaturierung des Proteins durch Schaumentwicklung zu verhindern. Die vollständige Umsetzung wurde anhand des Absorptionsspektrums im Bereich zwischen 450 und 650 nm geprüft.

4. Rindererythrozyten-Hämolysat

Aus frischem Rinderblut (dem auf 1,5l 2g Glucose sowie zur Gerinnungshemmung 20g Natriumcitrat zugesetzt wurden) wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 3000g die Erythrozyten abgetrennt. Diese wurden dreimal mit dem gleichen Volumen an 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in dem gleichen Volumen dest. Wasser suspendiert und mit Hilfe von Ultraschall vollständig hämolysiert.

Um hierbei eine Erwärmung zu verhindern, wurde mit Eis gekühlt und sechsmal je 30 s (mit Pausen von 30 s) beschallt.

5. Konzentrationsbestimmung von Hämoglobin-Lösungen und Ermittlung des Ferrihämoglobingehaltes

Beide Bestimmungen können mit Hilfe der Cyanid-Methode nach Kiese (1974) gleichzeitig photometrisch durchgeführt werden. Dazu werden 100 μ l der Hämoglobin-Lösung mit 5,5 ml 0,2 M Sörensenpuffer pH 6,6 gemischt und in zwei 1 cm Küvetten gefüllt. Nach dem Ablesen der Küvettendifferenz bei 550 nm wird der Probenküvette Kaliumcyanid zugesetzt. Das in der Lösung enthaltene Ferrihämoglobin bildet dabei einen Cyan-Ferrihämoglobin-Komplex, der durch seine höhere Extinktion bei 550 nm quantitativ bestimmt wird. Anschließend werden beide Hämoglobin-Lösungen durch Zusatz von je 20 μ l 10 %iger Kaliumferricyanid-Lösung vollständig oxidiert. In der Probenküvette wird daher das gesamte Hämoglobin in den Cyan-Ferrihämoglobin-Komplex umgewandelt, aus dessen Extinktion bei 550 nm man die absolute Hämoglobin-Konzentration erhält. Bei einer Verdünnung von 0,1 ml auf 5,6 ml sind pro Extinktionseinheit 15,31 g Hämoglobin in 100 ml Lösung enthalten.

6. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Bei allen Trennungen wurden analytische Säulen mit reversed phase Säulenmaterial verwendet (Typ : siehe Geräte).

Zur quantitativen Analyse von N-Hydroxy-4-chloranilin und dessen Umwandlungsprodukten (4-Chloranilin, 4-Chlornitrosobenzol, 4-Chlornitrobenzol und Bisazoxychlorbenzol) wurde

als Fließmittel ein Gemisch Methanol-Wasser (70:30 v/v) verwendet. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,7 ml/min und einem Druck von 2000 PSI (pounds per square inch) wurden folgende Retentionszeiten bestimmt: 4-Chloranilin: 2,7 min; N-Hydroxy-4-chloranilin: 3,1 min; 4-Chlor-nitrobenzol: 4,8 min; 4-Chlor-nitrosobenzol: 5,8 min; Bisazoxychlorbenzol: 15,5 min.

Zur Analyse von N-Hydroxy-4-chloracetanilid und seinen Reaktionsprodukten wurde als Fließmittel ein Gemisch aus Wasser, Methanol und Essigsäure (60:30:10 v/v) verwendet. Bei einem Durchfluß von 1,8 ml/min und einem Druck von 2100 PSI wurden folgende Retentionszeiten gemessen: 4-Chloranilin: 5,0 min; N-Hydroxy-4-chloranilin: 6,2 min; N-Hydroxy-4-chloracetanilid: 7,6 min; 4-Chloracetanilid: 8,7 min; N-Acetoxy-4-chloracetanilid: 10,4 min; 4-Chlor-nitrobenzol: 14,6 min; 4-Chlor-nitrosobenzol: 17,1 min. (Die Retentionszeiten unterlagen geringen Schwankungen, die vom Packungszustand und dem Alter der Säule abhängig waren. Die angegebenen Retentionszeiten sind typische Werte, die bei Verwendung einer neuen Säule erhalten wurden.) Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand der UV-Absorption bei 254 und 280 nm. Durch den Vergleich mit definierten Standard-Lösungen wurde aus der Peakhöhe (bzw. der Peakfläche bei breiten Peaks) die Konzentration ermittelt. Es wurde jeweils der höhere Peak (bei 254 oder 280 nm) zur Auswertung benutzt.

7. Dünnschichtchromatographie

Zur Analyse der Oxidationsprodukte von N-Hydroxy-4-chloracetanilid wurden Kieselgel-Fertigplatten mit 0,25 cm Schichtdicke und selbst beschichtete Platten (Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck, Darmstadt) verwendet. Nach 2 bis 4-maligem Entwickeln in

Chloroform - Methanol (98 : 2 v/v) oder (99 : 1 v/v) wurden die einzelnen Zonen abgenommen und die adsorbierten Verbindungen mit Chloroform, Methanol, Diethylether oder Gemischen aus diesen Lösungsmitteln eluiert. Die Quantifizierung der Produkte erfolgte mit Hilfe des UV-Spektrums. Zur Lokalisierung der einzelnen Verbindungen auf der Platte diente die Löschung der Fluoreszenz des UV-Fluoreszenz-Indikators. Zur Identifizierung bereits bekannter Produkte wurden Vergleichssubstanzen parallel chromatographiert.

8. Messung von gelöstem Sauerstoff

Zur Bestimmung der Sauerstoff-Konzentration in wässrigen Lösungen wurde eine Clark'sche Sauerstoffelektrode verwendet. Die Platin-Elektrode wurde entsprechend den Angaben der Hersteller mit einer Teflon-Membran überzogen. Als Leitsalz diente KCl in gesättigter Lösung. Die Einstellung des Nullpunktes der Meßskala erfolgte mit einer Lösung von Natriumdithionit in Wasser, in der Sauerstoff vollständig reduziert wurde. Zur Eichung wurde bidestilliertes, mit Luft unter Normaldruck gesättigtes Wasser verwendet. Die hierin gelöste O_2 -Menge wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet: $x = p \cdot \alpha \cdot 12,31$.

x: gelöste O_2 -Menge in $\mu\text{mol/l}$

p: aktueller Luftdruck in Torr

α : Bunsen'scher Absorptionskoeffizient.

Die obige Formel ergibt sich aus der Definition des Absorptionskoeffizienten α , der das Volumenverhältnis des gelösten Gases zum Flüssigkeitsvolumen angibt: $\alpha = \frac{V(\text{Gas})}{V(\text{Lösung})}$.

Unter Berücksichtigung des Henry'schen Gesetzes $c_{\text{vol}} = \alpha \cdot p(\text{O}_2)$ erhält man aus α und dem Partialdruck von Sauerstoff $p(\text{O}_2)$ die Volumen-Konzentration (c_{vol}) von O_2 : $c_{\text{vol}} = \frac{V(\text{Gas})}{V(\text{Lösung})} \cdot p(\text{O}_2)$

Nach Division durch das Molvolumen von Sauerstoff (23,393 l/mol; aus Handbook of Chemistry and Physics 63rd Ed.) ergibt sich die Konzentration von O_2 : $c = \frac{\alpha \cdot p(\text{O}_2)}{23,393} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$.

Der Partialdruck von O_2 läßt sich aus dem aktuellen Luftdruck (p , in Torr) und dem Sauerstoffgehalt der Luft (20,946 %; aus Handbook of Chemistry and Physics 63rd Ed.) nach der Formel $p(\text{O}_2) = \frac{p}{760} \cdot \frac{20,946}{100}$ berechnen. Setzt man diesen Ausdruck in die vorherige Gleichung ein, so erhält man $c = \frac{\alpha}{23,393} \cdot \frac{p}{760} \cdot \frac{20,946}{100} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right]$ bzw. $c = \alpha \cdot p \cdot 12,31 \left[\mu\text{mol/l} \right]$.

Der Zahlenwert von α wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Meßtemperatur aus Abb. 2 ermittelt. Die Kurve wurde mit Hilfe der bei Umbreit et al. (1965) angegebenen α -Werte erstellt (um die Extrapolation auf beliebige Temperatur-Zwischenwerte zu vereinfachen).

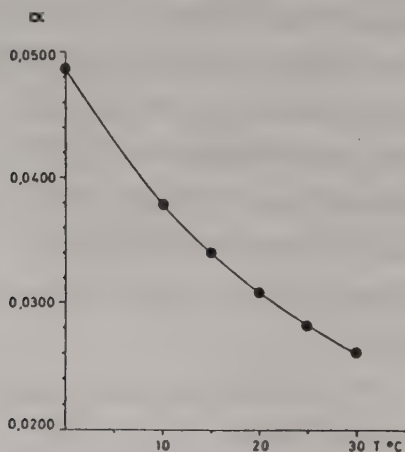


Abb. 2 Die Temperaturabhängigkeit des Bunsen'schen Absorptionskoeffizienten α nach Umbreit et al. (1965)

9. Bestimmung von H_2O_2

Zur Bestimmung von H_2O_2 in proteinfreien wässrigen Lösungen (z.B. bei der Autoxidation von N-OH-4ClA) wurde die von Hildebrandt et al. (1978) beschriebene Methode verwendet, die auf der Oxidation von Eisen(II) zu Eisen(III) durch H_2O_2 beruht.

Proben von jeweils 2,5 ml wurden mit 0,5 ml einer 10^{-2} molaren wässrigen Lösung von $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und mit 0,2 ml einer 2,5 molaren KSCN-Lösung gemischt. Das durch H_2O_2 gebildete $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ wurde auf Grund seiner Extinktion bei 480 nm quantitativ bestimmt. Mit Hilfe einer Eichreihe wurde als Nachweisgrenze dieser Methode eine Konzentration von 10^{-6} mol/l H_2O_2 ermittelt.

10. ESR-Spektroskopie

Das bei der Autoxidation von N-OH-4ClA auftretende primäre Nitroxid wurde mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen (Spektrum: S. 25) und der zeitliche Verlauf der Signalintensität aufgezeichnet (S. 24). Als Meßzelle diente eine Glaskapillare von 2mm Innendurchmesser. Die beste Auflösung des Spektrums wurde mit folgenden Meßparametern erzielt: Feldstärke 3348 Gauß, Modulationsamplitude 2,5 Gauß, Modulationsfrequenz 10 kHz, Mikrowellenfrequenz 9,35 GHz, Mikrowellenleistung 5 mW.

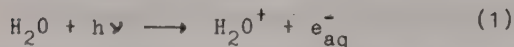
Da bei der Reaktion von Oxyhämoglobin mit N-OH-4ClAA ein sekundäres Nitroxid als Zwischenprodukt postuliert wird, wurde versucht, dieses mit Hilfe der ESR-Spektroskopie direkt nachzuweisen. Durch Oxidation der Hydroxamsäure mit PbO_2 in Toluol wurde eine Lösung des authentischen Radikals erzeugt. Anhand

dieser Lösung wurden die Meßparameter optimiert, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit zu erreichen (Feldstärke 3348 Gauß, Modulationsamplitude 0,05 Gauß, Modulationsfrequenz 10 KHz, Mikrowellenfrequenz 9,15 GHz, Mikrowellenleistung 2 mW). Die Messung an der Probe wurde unmittelbar nach dem Mischen in einer Glaskapillare von 2 mm Innendurchmesser durchgeführt.

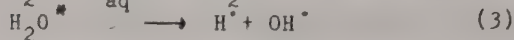
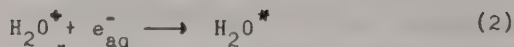
11. Radiolyse-Experimente

Um die Reaktion von N-OH-4-ClAA mit verschiedenen Sauerstoffradikalen zu untersuchen, wurden 10^{-4} molare Lösungen der Hydroxamsäure in 0,06 M Phosphatpuffer pH 7,4 unter verschiedenen Bedingungen mit Hilfe einer Röntgenröhre kontinuierlich bestrahlt.

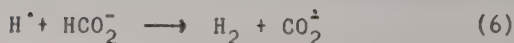
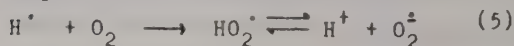
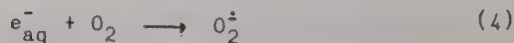
Bei der Wasserradiolyse entstehen durch die primäre Ionisation solvatisierte Elektronen:

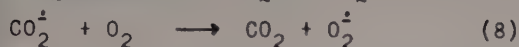
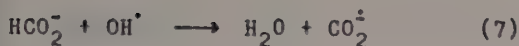


Durch Rekombination und anschließende Dissoziation des angeregten Wassermoleküls werden außerdem H- und OH- Radikale gebildet:

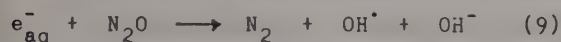


Zur Erzeugung von $\text{O}_2^\cdot$ wurden der Hydroxamsäure-Lösung 10^{-2} mol/l Natriumformiat zugesetzt. Unmittelbar vor der Bestrahlung wurde die Lösung mit Sauerstoff gesättigt. Unter diesen Bedingungen werden die Primärprodukte zu ca. 90% in $\text{O}_2^\cdot$ umgewandelt, wobei folgende Reaktionen eine Rolle spielen:





Zur Erzeugung von OH-Radikalen wurde die Hydroxamsäure-Lösung vor dem Bestrahlen mit N_2O gesättigt. Dabei wird die Bildung von $\text{O}_2^\cdot$ nach Gleichung (4) unterdrückt, da die Reaktion (9) wesentlich schneller als Reaktion (4) verläuft:



Auf diese Weise werden ca. 90% $\text{OH}^\cdot$ und ca. 10% $\text{H}^\cdot$ erhalten.

Um die gleichzeitige Einwirkung von $\text{OH}^\cdot$ und $\text{O}_2^\cdot$ zu untersuchen, wurde in einem dritten Ansatz die Hydroxamsäure-Lösung unter Sauerstoffsättigung, jedoch ohne weitere Zusätze bestrahlt.

In einem vierten Ansatz wurde unter Zusatz von 10^{-2} mol/l Formiat bestrahlt. Dabei werden als Hauptprodukte solvatisierte Elektronen und die reduzierenden Radikale $\text{H}^\cdot$ und $\text{CO}_2^\cdot$ gebildet. Die hier angewandten Radiolysebedingungen sind bei Asmus (1984) beschrieben. In der folgenden Tabelle sind die Strahlungsdosen und die Gesamtkonzentrationen der jeweiligen Radikale zusammengestellt.

Radikal	$\text{O}_2^\cdot$		$\text{OH}^\cdot$		$\text{O}_2^\cdot, \text{OH}^\cdot$		$\text{e}^-, \text{H}^\cdot, \text{CO}_2^\cdot$	
Gesamtkonz. [mol/l]	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}
Dosisleistung [rad/min]	596,3	302,6	596,3	302,6	596,3	302,6	596,3	302,6
Bestrahlungszeit [min]	5,0	10,0	6,0	12,0	12,0	23,5	5,0	10,0
Dosis [rad]	2,98	30,26	3,58	36,31	7,16	71,11	2,98	30,26

Tab.1 Bestrahlungsbedingungen bei der Wasserradiolyse

12. Bestimmung von pK_a -Werten

Zur Bestimmung der pK_a -Werte von verschiedenen N-Arylaceto-hydroxamsäuren wurde die Methode von Albert (1971) verwendet. Die Messung beruht auf der pH-Abhängigkeit der UV-Absorption der Probe bei einer bestimmten Wellenlänge. Das UV-Spektrum der zu untersuchenden Verbindung wurde in 7 verschiedenen Pufferlösungen, deren pH-Wert auf 0,01 pH-Einheiten genau bekannt war, aufgenommen. (Die Referenzküvette wurde jeweils mit dem gleichen Puffer gefüllt.) Zur Auswertung wurde die Wellenlänge verwendet, bei der die größte Extinktionsdifferenz beobachtet wurde (N-OH-AA : 246 nm; N-OH-4ClAA : 250 nm; N-OH-3,4-DClAA : 255 nm; N-OH-4EAA : 280 nm;). Der pH-Wert der verwendeten Puffer lag etwa zwischen einer pH-Einheit über und einer pH-Einheit unter dem zu erwartenden pK_a -Wert. (Der ungefähre pK_a -Wert wurde in Vorversuchen ermittelt.) Außerdem wurde das Spektrum bei pH 2,0 und bei pH 12,0 aufgezeichnet, wo die Verbindungen undissoziiert bzw. vollständig dissoziiert vorlagen. Für jeden Extinktionswert d bei einem bestimmten pH-Wert ergibt sich nach der folgenden Formel der pK_a -Wert der Verbindung :

$$pK_a = pH + \log \frac{d_I - d}{d - d_M} \quad . \quad d_I \text{ und } d_M \text{ sind die Extinktionen in}$$

der vollständig dissoziierten bzw. undissoziierten Form der Verbindung. Als pK_a -Wert wurde der Mittelwert von 7 Meßwerten betrachtet, wenn alle Einzelmessungen in einem Bereich von 0,06 pH-Einheiten lagen.

ERGEBNISSE

1. Versuche zur Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin

Die gekoppelte Oxidation von Hämoglobin mit Arylhydroxylaminen läßt sich formal als Interaktion zweier Teilreaktionen auffassen, nämlich der Autoxidation von Hämoglobin und der Autoxidation des Arylhydroxylamins. Die Kenntnis der grundlegenden Reaktionen, die an der Autoxidation von Arylhydroxylaminen beteiligt sind, ist daher eine Voraussetzung für die mechanistische Aufklärung der gekoppelten Oxidation.

Da die bisher bekannten Experimente zur Autoxidation von Arylhydroxylaminen vorwiegend in organischen Lösungsmitteln durchgeführt wurden (siehe Diskussion), sollte hier die Reaktion unter annähernd physiologischen Bedingungen untersucht werden.

1.1. Zeitabhängige Analyse der Reaktionsprodukte

Die Autoxidation von N-OH-4ClA wurde an einer 10^{-3} molaren Lösung in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (9 : 1 v/v) bei Raumtemperatur untersucht. Hierzu wurden 2ml einer 10^{-2} molaren methanolischen Lösung des Arylhydroxylamins mit 18ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 gemischt (ergibt 20ml einer 10^{-3} molaren Lösung) und in einem verschlossenen 25ml Erlenmeyerkolben 6h bei 25° C gerührt. Nach verschiedenen Zeiten wurden jeweils 0,5ml entnommen und zur Auflösung der kolloidalen Bestandteile mit 2ml Methanol gemischt. 50 μ l dieser Lösung wurden jeweils unmittelbar danach in den Chromatographen injiziert (Trennsystem siehe Methodenteil). Die zeitliche Entwicklung der Reaktionsprodukte ist in Abb. 3 dargestellt, wobei die Mittelwerte aus zwei Experimenten wiedergegeben sind.

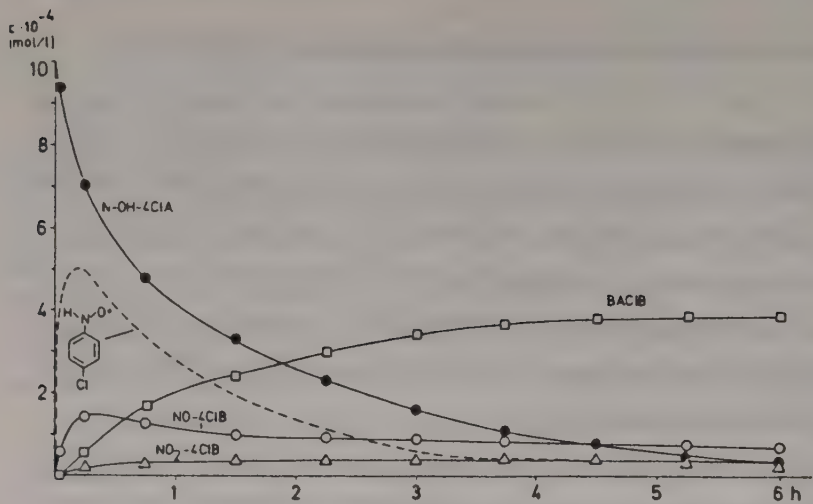


Abb. 3 Die Autooxidation von 10^{-3} M N-OH-4ClA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (9 : 1 v/v) bei 25°C

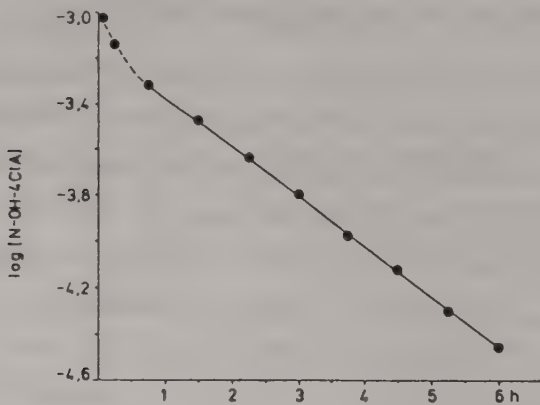


Abb. 4 Die Kinetik der Autooxidation von N-OH-4ClA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (9 : 1 v/v) bei 25°C

Die kinetische Analyse (Abb. 4) zeigt, daß der Zerfall von N-OH-4ClA von 30 min an einem Zeitgesetz pseudo-erster

Ordnung folgt ($k=6,42 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Aus der größeren Anfangsneigung der Geraden in Abb. 4 erkennt man, daß die Abnahme von N-OH-4ClA in den ersten 30 min nach einer Reaktionsordnung größer als eins erfolgt. Für die Bildung der übrigen Produkte wurde keine ganzzahlige Reaktionsordnung gefunden.

NO-4ClB, das als primäres Oxidationsprodukt mit der größten Bildungsgeschwindigkeit entsteht, reagiert im weiteren Verlauf der Reaktion mit N-OH-4ClA zu Bisazoxychlorbenzol. Aus der Überlagerung der beiden Reaktionen resultiert ein Maximum der Konzentration von NO-4ClB von ca. 15%, das nach etwa 15 min beobachtet wird. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht NO₂-4ClB, das innerhalb von 2 h zu ca. 4% gebildet wird. Die unterbrochene Linie in Abb. 3 gibt die zeitliche Veränderung der Intensität des ESR-Signals wieder, das bei einem Parallel-experiment unter den gleichen Bedingungen erhalten wurde. Das in Abb. 5 dargestellte Spektrum zeigt, daß ein primäres Nitroxid, das 4-Chlorphenylnitroxid gebildet wird.

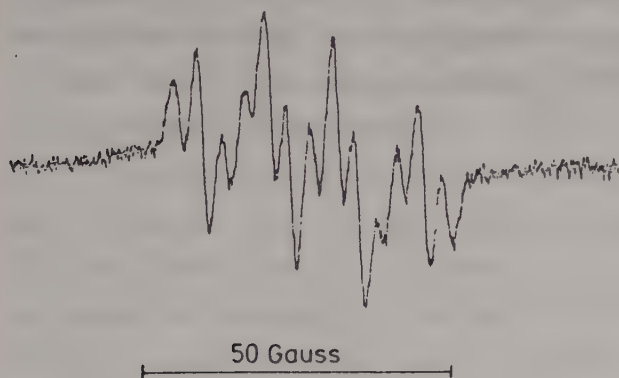


Abb. 5 ESR-Spektrum von 4-Chlor-phenylnitroxid

Der Ordinatenmaßstab in Abb. 3 besitzt für die Kurve des primären Nitroxids keine Gültigkeit, da die tatsächliche Konzentra-

tion des Radikals nicht ermittelt werden konnte. Diese Kurve soll daher lediglich die zeitliche Parallelität zwischen der relativen Radikalkonzentration und der Veränderung des Produktmusters aufzeigen.

1.2. Die Kinetik der Sauerstoffaufnahme

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs einer 10^{-3} molaren Lösung von N-OH-4ClA wurden in der geschlossenen Meßzelle einer Clark'schen Sauerstoffelektrode 3,6 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 vorgelegt und 0,4 ml einer 10^{-2} molaren methanolischen Lösung von N-OH-4ClA in die Meßzelle injiziert. Die Konzentration des gelösten Sauerstoffs wurde über 6 h aufgezeichnet. Die kinetische Analyse (Abb. 6) zeigt, daß der Sauerstoffverbrauch über einen Zeitraum von 4 h nach einem Zeitgesetz der zweiten Ordnung erfolgt. Da das Arylhydroxylamin und Sauerstoff in nahezu äquimolarem Verhältnis vorlagen, kann man aus der Kinetik 2. Ordnung schließen, daß die Reaktion bezüglich beider Partner nach 1. Ordnung verläuft. (Die Geschwindigkeitsgleichung $-\frac{d[O_2]}{dt} = k[O_2][N-OH-4ClA]$ kann unter diesen Bedingungen in der Form $-\frac{d[O_2]}{dt} = k[O_2]^2$ geschrieben werden.)

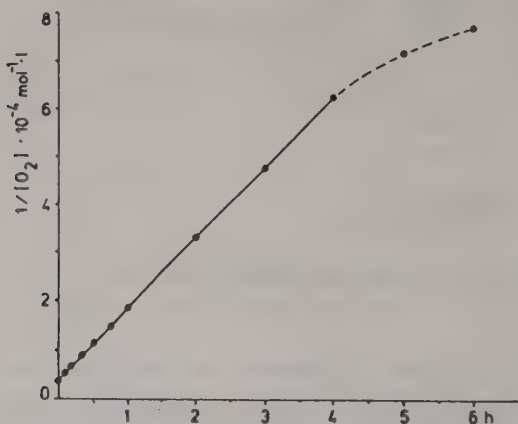


Abb. 6 Kinetik der O_2 -Utilisierung bei der Autoxidation von N-OH-4ClA in 0,2M Phosphatpuffer pH 7,4-Methanol(9:1) bei 25°C

1.3. Die Bedeutung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot -}$

Zur Klärung der Frage, ob bei der Autoxidation von Arylhydroxylaminen H_2O_2 gebildet wird, wurde die auf S.19 beschriebene Nachweismethode für H_2O_2 verwendet.

20 ml einer 10^{-3} molaren Lösung von N-OH-4-ClA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4-Methanol (9:1 v/v) wurden bei 25°C in einem verschlossenen 25 ml Erlenmeyerkolben gerührt. Nach 3,15, 30, 60, 120 und 360 Min. wurden jeweils 2,5 ml entnommen und (wie auf S.19 beschrieben) mit $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ und KSCN gemischt. Zu keinem Zeitpunkt der Reaktion konnte eine Extinktionserhöhung bei 480 nm gemessen werden. Die Konzentration von H_2O_2 überschreitet also die Nachweisgrenze von 10^{-6} mol/l während der gesamten Reaktion nicht.

In einem zu 1.2. analogen Experiment wurde die Sauerstoffaufnahme einer 10^{-3} molaren Lösung von N-OH-4ClA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (99:1 v/v) gemessen, wobei 200 U/ml Katalase bzw. 200 U/ml Superoxid-Dismutase zugesetzt wurden. In beiden Fällen wurde keine signifikante Veränderung der Sauerstoffaufnahme beobachtet.

Nach 24 h wurden jeweils die Reaktionsprodukte mit Hilfe der HPLC analysiert. Dabei wurden jeweils 47% Bisazoxychlorbenzol neben 2% 4-Chlornitrobenzol gefunden.

Der Zusatz von Katalase bzw. Superoxid-Dismutase verändert also weder die Kinetik der Sauerstoffaufnahme noch das Verhältnis der Reaktionsprodukte.

H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot -}$ haben also keinen Anteil an der geschwindigkeitsbestimmenden Teilreaktion und sind wahrscheinlich auch für die Gesamtreaktion ohne wesentliche Bedeutung.

Die Anwesenheit von H_2O_2 in geringer stationärer Konzentration ist dennoch nicht vollständig auszuschließen, da nach Cohen und Hochstein (1963) Katalase bei sehr niedrigen H_2O_2 -Konzentrationen unwirksam ist.

2. Versuche mit gereinigtem Human-Hämoglobin und N-OH-4ClA

Die vorliegenden Untersuchungen zur Ferrihämoglobin-Bildung durch Arylhydroxylamine weisen darauf hin, daß sich die initiale Reaktion, die man als gekoppelte Oxidation bezeichnet, aus mehreren Teilreaktionen bzw. Gleichgewichten zusammensetzt. Dies geht vor allem aus Experimenten von Kiese (1974) hervor, die beweisen, daß "die Kopplung nicht ganz fest" ist, d.h., daß die Stöchiometrie der Reaktion vom Verhältnis der Reaktanden abhängig ist. (Bei einem 10-fachen Überschuß an Hämoglobin wird pro mol Phenylhydroxylamin 1 Äquivalent Hämoglobineisen oxidiert, bei äquimolarem Verhältnis werden dagegen nur 0,3 Äquivalente Eisen oxidiert.)

Die folgenden Experimente zielen daher auf die Aufklärung der Vorgänge, die parallel zur gekoppelten Oxidation ablaufen. Die Versuche wurden mit N-OH-4ClA durchgeführt, da sich diese Verbindung beim Vergleich mit anderen Arylhydroxylaminen (Sterzl, 1984) als besonders aktiver Ferrihämoglobinbildner erwies.

2.1. Oxyhämoglobin

Die Reaktion von 10^{-3} M N-OH-4ClA mit 10^{-3} M Oxyhämoglobin wurde bei 25°C verfolgt, indem die Ferrihämoglobin-Bildung, der Sauerstoffgehalt der Lösung sowie die Veränderung des

Produktmusters synchron bestimmt wurden. In einem Parallel-experiment wurde der Zerfall von 4-Chlorphenylnitroxid, das bei Reaktionsbeginn gebildet wurde, mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

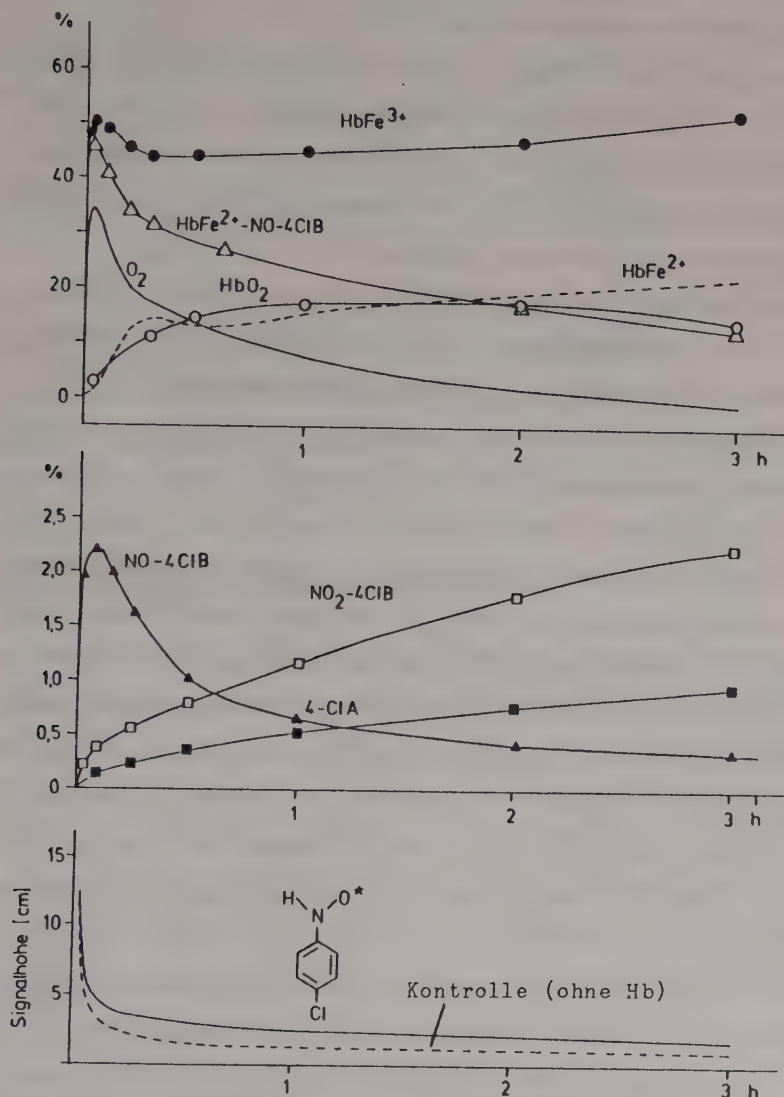


Abb. 7 Die Reaktion von 10^{-3}M HbO_2 mit 10^{-3}M N-OH-4ClA in $0,2\text{M}$ Phosphatpuffer pH 7,4 bei 25°C ; HbFe^{3+} - und O_2 -Kurve: Mittelwerte aus 4 Versuchen; alle übrigen Kurven: Mittelwerte aus 2 Experimenten;

2.1.1. Reaktionsprodukte

Die Analyse der Reaktionsprodukte wurde mit Hilfe der HPLC durchgeführt, wobei die Proben ohne vorherige Aufarbeitung in den Chromatographen injiziert wurden, um Verluste des flüchtigen Nitrosoarens zu vermeiden.

Wie man aus Abb. 7 erkennt, gliedert sich die Reaktion in drei Phasen von unterschiedlicher Geschwindigkeit: eine schnelle Anfangsreaktion (bis 3 min), ein Bereich von mittlerer Reaktionsgeschwindigkeit (3 bis ca. 20 min) und eine relativ langsame Phase gegen Ende der Reaktion.

Während der initialen Phase erfolgt eine sehr schnelle Umwandlung des Arylhydroxylamins. Nach 1 min wurden 15% N-OH-4ClA gefunden, nach 3 min war es nicht mehr nachweisbar.

Als Hauptprodukt wurde NO-4ClB gebildet. 46% (bezogen auf die ursprüngliche Menge an N-OH-4ClA) lagen nach 3 min in gebundener Form als Hämoglobin-Komplex (HbFe^{2+} -NO-4ClB) vor. (Dieser Anteil konnte erst nach Oxidation mit $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ bestimmt werden.) Der nicht gebundene, in Lösung befindliche Anteil betrug nach 3 min 2,2%. Neben Spuren von Bisazoxychlorbenzol ($< 0,05\%$) wurden nach 3 min 0,3% NO_2 -4ClB und 0,1% 4-ClA gefunden. Insgesamt konnten nach 3 min nur 48,6% des eingesetzten Materials wiedergefunden werden. Ein großer Teil wird vermutlich kovalent an das Protein gebunden. Aus Versuchen von Kiese und Taeger (1976) ist bekannt, daß Phenylhydroxylamin an SH-Gruppen des Globin gebunden wird.

In der zweiten Phase der Reaktion wird der Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex relativ schnell wieder zersetzt, wobei die Parallelität zur Abnahme der O_2 -Konzentration auffällt. Die kinetische Auswertung (Abb. 8) zeigt, daß HbFe^{2+} -NO-4ClB nach

dem Zeitgesetz der 2. Ordnung zerfällt. (Die scheinbare Geschwindigkeitskonstante k_2 beträgt $0,38 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$.) Trotz der qualitativen Ähnlichkeit der O_2 -Kurve folgt die Kinetik des Sauerstoffverbrauchs nicht dem selben Zeitgesetz.

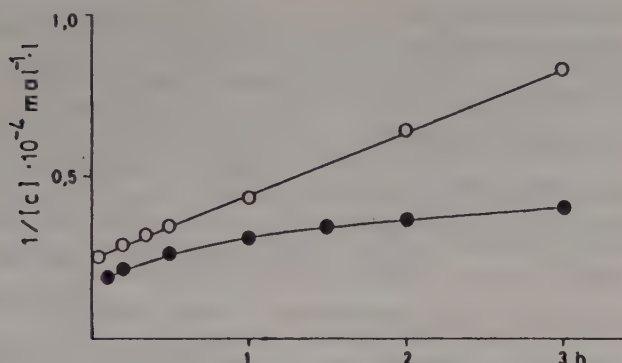


Abb. 8 $10^{-3} \text{ M HbO}_2 + 10^{-3} \text{ M N-OH-4ClA}$; Temp.: 25°C ;

Kinetik des Zerfalls von $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO-4ClB}$ ○

Kinetik des O_2 -Verbrauchs ●

2.1.2. Veränderung der O_2 -Konzentration

Der Maßstab der O_2 -Kurve in Abb. 7 bezieht sich auf die ursprünglich an Hämoglobin gebundene Sauerstoffmenge ($100\% \hat{=} 10^{-3} \text{ mol/l}$). Die Konzentration an gelöstem Sauerstoff war vor Reaktionsbeginn $260 \mu \text{ mol/l}$. (Dieser Wert entspricht im verwendeten Maßstab 26%.) Innerhalb von 3 min wurde HbO_2 zu 96% in HbFe^{3+} bzw. $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO-4ClB}$ umgewandelt. Die Tatsache, daß im gleichen Zeitraum nur 34% des ursprünglich gebundenen Sauerstoffs freigesetzt wurden, zeigt, daß in der Anfangsphase der Reaktion ein großer Teil des Sauerstoffs reduziert wurde. In der zweiten Phase der Reaktion (zwischen 3 und 20 min) nahm die O_2 -Konzentration rasch ab. Als Ursachen hierfür kommen die Autoxidation des Hämoglobin-NO-4ClB-Adduktes sowie die Rückbildung von HbO_2 in Frage. Diese beiden

Prozesse sind vermutlich auch für den anschließenden langsameren Sauerstoffverbrauch verantwortlich.

2.1.3. Ferrihämoglobin-Bildung

Während der initialen Phase der Reaktion wurden innerhalb von 3 min 50% HbFe^{3+} gebildet. Im Anschluß daran wurde eine langsame Reduktion von HbFe^{3+} beobachtet, wobei der Anteil an Ferrihämoglobin auf 44% sank (nach 20 min), ehe eine erneute, sehr langsame Ferrihämoglobin-Bildung erfolgte. Die zwischenzeitliche Reduktion von HbFe^{3+} wurde in früheren Versuchen mit HbO_2 und N-OH-4ClA (Sterzl, 1984) nicht beobachtet, da die Reaktion im offenen System untersucht worden war. Bei einem Parallelversuch, der unter den gleichen Bedingungen, jedoch in einem offenen Reaktionsgefäß (an Stelle der geschlossenen O_2 -Meßzelle) durchgeführt wurde, wurde ebenfalls keine HbFe^{3+} -Reduktion gemessen. (Innerhalb von 30 min erfolgte ein kontinuierlicher Anstieg des HbFe^{3+} -Anteils auf 63%.)

2.1.4. Folgereaktionen

Im Anschluß an die initiale Phase der Ferrihämoglobin-Bildung wurde eine langsame Rückbildung von Oxyhämoglobin beobachtet. Der Anteil an HbO_2 wurde durch Oxidation mit Kaliumferricyanid bestimmt, wobei die momentane Freisetzung von Sauerstoff gemessen wurde. (Der Verlauf der HbO_2 -Rückbildung wurde durch Oxidation zu verschiedenen Zeitpunkten ermittelt, wobei die Reaktion jedesmal neu gestartet wurde.) Da parallel zur Bildung von HbO_2 eine Abnahme der O_2 -Konzentration sowie die Zersetzung des HbFe^{2+} -NO-4ClB-Komplexes erfolgt, bietet sich der Ligandenaustausch O_2 gegen NO-4ClB als Erklärung an.

Während der Reaktion wurde mit Hilfe der Cyanid-Methode sowie durch direkte spektroskopische Bestimmung (als HbFe^{3+}) die Gesamtkonzentration an Hämoglobin gemessen. Dabei wurde innerhalb von 4h keine Abnahme der Konzentration festgestellt (Messgenauigkeit $\pm 0,3\%$), die eine Denaturierung des Proteins ergeben hätte. Die in der Massenbilanz fehlende Hämoglobinmenge (unterbrochene Linie in Abb.7 oben: HbFe^{2+}) gibt daher mit großer Wahrscheinlichkeit die Konzentration von Desoxyhämoglobin wieder. Auf Grund der Ferrihämoglobin-Bestimmung kommt nur ein Hämoglobinderivat mit zweiwertigem Eisen in Betracht.

2.1.5. Bildung und Zerfall von 4-Chlorphenylnitroxid

Um zu prüfen, in welcher Weise das primäre Nitroxid, das bei der Autoxidation von N-OH-4ClA beobachtet wird, an der Reaktion von N-OH-4ClA mit HbO_2 beteiligt ist, wurde in einem Parallelexperiment die Veränderung des ESR-Signals über 3 h hinweg verfolgt. Dabei wurde keine qualitative Änderung des Spektrums beobachtet. Die Intensität des Signals nahm zu Beginn der Reaktion sehr rasch ab. Nach ca. 20 min wurde dagegen ein langsames Abklingen der radikalischen Aktivität gemessen (Abb. 7). Um den Einfluß von Hämoglobin auf die Bildung und den Zerfall des Nitroxids zu untersuchen, wurde bei der Autoxidation von N-OH-4ClA unter den gleichen Bedingungen (in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4; 25°C) die Änderung des ESR-Signals aufgezeichnet. Dabei wurde qualitativ der gleiche zeitliche Verlauf beobachtet. Die Intensität des Restsignals zwischen 15 und 180 min war jedoch nur etwa halb so groß wie beim entsprechenden Versuch mit Hämoglobin.

2.1.6. Einfluß von Katalase und Superoxid-Dismutase

Um einen Hinweis auf die Beteiligung von H_2O_2 bzw. $\text{O}_2^{\cdot-}$ an der Reaktion ($10^{-3}\text{M HbO}_2 + 10^{-3}\text{M N-OH-4ClA}$; 25°C) zu erhalten, wurden die Ferrihämoglobin-Bildung und die Veränderung der O_2 -Konzentration unter dem Einfluß von Katalase bzw. Superoxid-Dismutase untersucht. Hierzu wurde jeweils 200 U/ml des betreffenden Enzyms vor Beginn der Reaktion bzw. 20 min danach zugesetzt. Bei keinem der vier Experimente wurde eine signifikante Abweichung ($< 2\%$) gegenüber den in Abb. 7 gezeigten Meßergebnissen festgestellt.

2.1.7. Die Veränderung der O_2 -Konzentration in Abhängigkeit vom Verhältnis HbO_2 zu N-OH-4ClA

Durch die vorhergehenden Experimente wurde gezeigt, daß ein Teil des Hämoglobin-Sauerstoffs während der schnellen Anfangsphase der Ferrihämoglobin-Bildung reduziert wird. Um zu entscheiden, in welchem Maße die (eventuell durch Hb katalysierte) Autoxidation von N-OH-4ClA für die Reduktion von O_2 verantwortlich ist, wurde die Veränderung der O_2 -Konzentration bei verschiedenen Verhältnissen $\text{HbO}_2/\text{N-OH-4ClA}$ gemessen. Die Konzentration von N-OH-4ClA war bei allen Versuchen $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Die Konzentration von HbO_2 war jeweils das $\frac{1}{n}$ -fache der Konzentration an N-OH-4ClA ($n=1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100$). Die Hämoglobin-Lösungen (in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) wurden in der Meßzelle der Sauerstoffelektrode vorgelegt, in die das Arylhydroxylamin in 0,2 molarer methanolischer Lösung injiziert wurde. Die Lösung enthielt daher jeweils 0,5% Methanol. (Methanol wurde zur Entfernung von

Sauerstoff vor Gebrauch 10 min lang mit N_2 durchspült.)

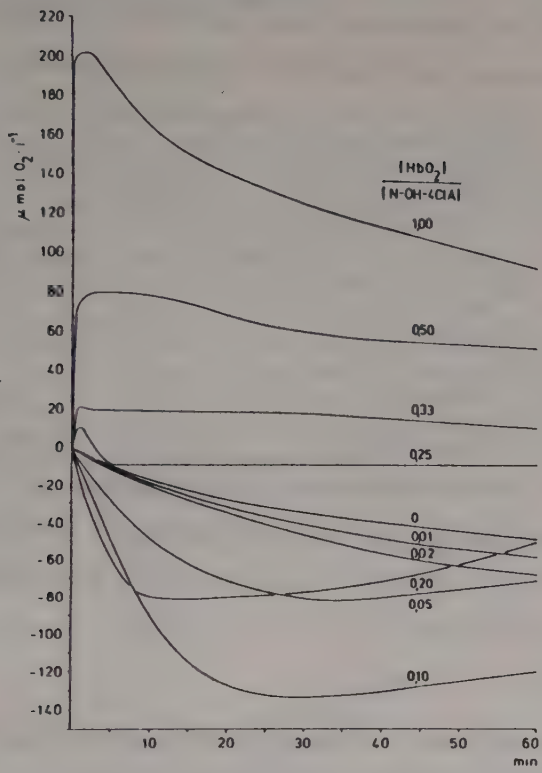


Abb. 9 $5 \cdot 10^{-4}$ M N-OH-4ClA in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (99,5 : 0,5 v/v) + $x \cdot 5 \cdot 10^{-4}$ M HbO_2 ($x = 1.00 - 0.01$); $T = 25^\circ C$; Veränderung der O_2 -Konzentration;

Nach Zusatz von 1, 1/2, 1/3 und 1/4 Äquivalenten HbO_2 wurde zu Beginn der Reaktion infolge der Ferrihämoglobin-Bildung Sauerstoff freigesetzt, von dem ein Teil in der anschließenden Phase der Reaktion wieder verbraucht wurde. Ab einem 5-fachen Überschuß an N-OH-4ClA war keine Freisetzung von Sauerstoff mehr zu beobachten. Die O_2 -Konzentration fiel anfangs rasch ab, wobei die Geschwindigkeit der initialen O_2 -Utilisierung proportional zur HbO_2 -Konzentration war (Abb. 10, S. 37).

Bei den Versuchen mit 1/50 und 1/100 Äquivalent HbO_2 näherten sich die O_2 -Kurven derjenigen der Autoxidation des Arylhydroxylamins. Bei den Ansätzen, bei denen Sauerstoff freigesetzt wurde, wurde zum Zeitpunkt der maximalen O_2 -Konzentration der Anteil an Ferrihämoglobin mit Hilfe der Cyanid-Methode bestimmt. Bei $x=1$ waren nach 3 min 53% des Hämoglobins oxidiert, bei $x=0,50$ nach 3 min 94%, bei $x=0,33$ und $x=0,25$ nach 2 min jeweils 100%. Pro Äquivalent HbFe^{3+} wurden folglich 0,83, 0,34, 0,12 und 0,08 Äquivalente O_2 freigesetzt. Beim Verhältnis $\text{HbO}_2/\text{N-OH-4ClA}$ von 1:4 erreichte die O_2 -Konzentration nach 5 min ein stationäres Gleichgewicht. (Auch beim Verhältnis 1:3 blieb die O_2 -Konzentration nach 2 min annähernd konstant.) Beim Übergang zu einem Fünftel Äquivalent HbO_2 trat dagegen unerwartet eine deutliche Änderung der O_2 -Kurve auf. Die initiale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs war bei diesem Verhältnis der Reaktanden am größten.

In einem weiteren Experiment wurde die O_2 -Freisetzung bei einem 5-fachen Überschuß von HbO_2 gemessen. Nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-4} \text{ M N-OH-4ClA}$ zu 10^{-3} M HbO_2 wurden bei 25°C in 4 min 23% HbFe^{3+} gebildet, wobei $176 (\pm 5) \mu\text{mol O}_2/\text{l}$ freigesetzt wurden ($\Delta 0,77$ Äquivalenten O_2 pro oxidiertem Eisenatom). Im weiteren Verlauf der Reaktion erfolgte eine langsame Ferrihämoglobin-Bildung (30% nach 1h) sowie ein deutlicher Abfall der O_2 -Konzentration auf $70 \mu\text{mol/l}$ nach 1h.

2.2. Die hämoglobinkatalysierte Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin

2.2.1. Veränderung der O_2 -Konzentration

Aus den O_2 -Kurven in Abb. 9 wird der Übergang von der gekoppelten Oxidation ($HbO_2/N\text{-OH-4ClA}=1$) zur hämoglobinkatalysierten Autoxidation von N-OH-4ClA sichtbar. Man erkennt aus Abb. 9, daß der katalytische Einfluß von HbO_2 nur bis zu einem Fünftel Äquivalent Hämoglobineisen pro Mol N-OH-4ClA untersucht werden kann. Um den störenden Einfluß des Hämoglobin-Sauerstoffs auszuschließen, wurden die in 2.1.6. beschriebenen O_2 -Messungen mit Ferrihämoglobin wiederholt.

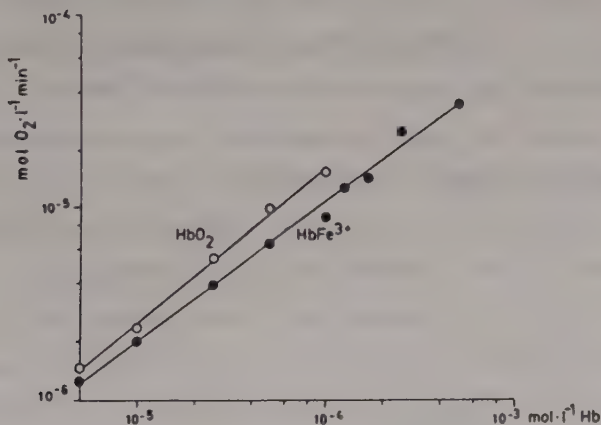


Abb. 10 Geschwindigkeit der initialen O_2 -Aufnahme bei der hämoglobinkatalysierten Autoxidation von $5 \cdot 10^{-4}$ M N-OH-4ClA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 - Methanol (99,5 : 0,5 v/v) bei 25°C in Abhängigkeit von der Hb-Konzentration;

Im untersuchten Konzentrationsbereich war sowohl bei Verwendung von HbO_2 als auch von $HbFe^{3+}$ die Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme proportional der Hb-Konzentration.

Der katalytische Effekt (d.h. die Erhöhung der Autoxidationsgeschwindigkeit) war bei den Reaktionen mit Oxyhämoglobin stets größer als bei den Reaktionen mit Ferrihämoglobin. Aus der etwas unterschiedlichen Neigung der beiden Geraden in Abb. 10 erkennt man, daß dieser Unterschied in der katalytischen Aktivität bei abnehmender Hb-Konzentration kleiner wird.

2.2.2. Spektroskopische Befunde

Um die Veränderung von Hb während der Hb-katalysierten Autoxidation von N-OH-4ClA zu untersuchen, wurde beim Verhältnis $\text{HbFe}^{3+}/\text{N-OH-4ClA}=0,2$ das Spektrum im Bereich von 500-700 nm in zeitlicher Abfolge aufgezeichnet. Um die Reaktionsbedingungen gegenüber der O_2 -Messung nicht zu verändern, wurden die Spektren ebenfalls im geschlossenen System (Thunberg-Küvetten) aufgenommen.

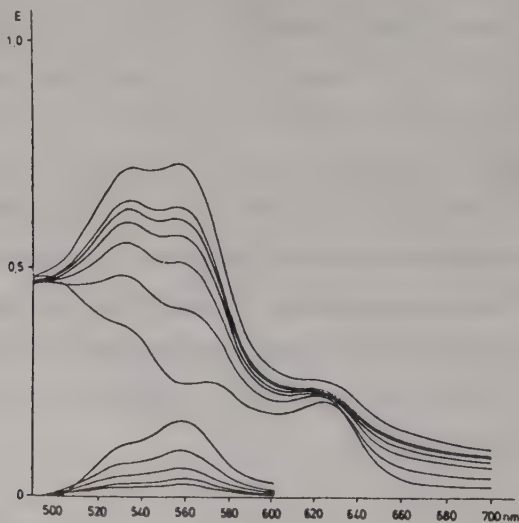


Abb. 11 Die zeitliche Veränderung des Elektronenspektrums von $5 \cdot 10^{-4} \text{ M HbFe}^{3+}$ bei der Reaktion mit $10^{-4} \text{ M N-OH-4ClA}$; ($t=0,2,5,8,11,14,50 \text{ min}$) unten: Extinktionsdifferenzen ($0-2,2-5,5-8,8-11,11-14 \text{ min}$)

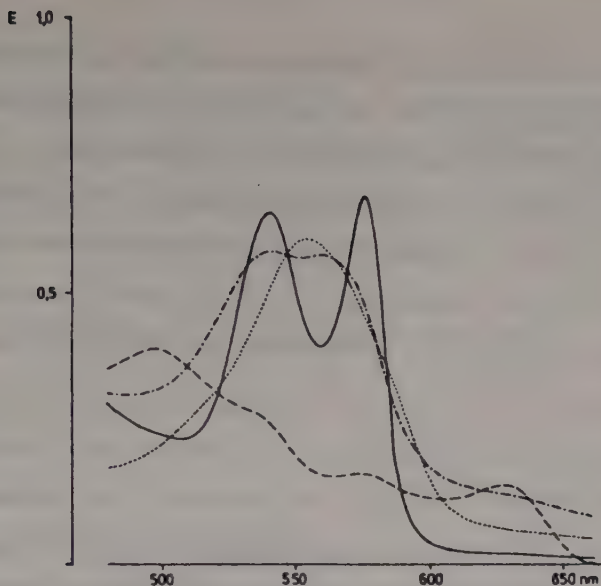


Abb. 12 Spektren verschiedener Hb-Derivate

— HbO_2 --- HbFe^{3+} Desoxy-Hb -.-.- $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO-4ClB}$

Zu Beginn der Reaktion erfolgte ein rascher Extinktionsanstieg zwischen 500 und 600 nm, der die Reduktion von HbFe^{3+} anzeigt. Aus der Darstellung der Extinktionsdifferenzen (Abb. 11 unten) lassen sich Rückschlüsse auf die Art der reduzierten Hb-Spezies ziehen. Das Maximum der Extinktionserhöhung zwischen 0 und 2 min lag bei 558 nm, d.h. zwischen 552 (Maximum von Desoxy-Hb) und 561 nm (Maximum von $\text{HbFe}^{2+}\text{-NO-4ClB}$). Hieraus erkennt man, daß bei der Reduktion von Ferrihämoglobin primär Desoxyhämoglobin und das Nitrosoaren-Addukt gebildet wurden. Der Extinktionsanstieg zwischen 11 und 15 min (unterste Linie in Abb. 11) zeigt ein Maximum bei 561 nm. Man kann hieraus schließen, daß in dieser Phase der Reaktion die Reduktion von HbFe^{3+} hauptsächlich zur Bildung des Nitrosoaren-Komplexes ($\lambda_{\text{max}} = 561 \text{ nm}$) führt.

Da bei 567 nm kein deutlicher Extinktionsanstieg zu beobachten war, wurde wahrscheinlich nur sehr wenig HbO_2 zurückgebildet ($\text{HbO}_2 : \lambda_{\text{max}} = 540 \text{ u. } 567 \text{ nm}$). Diese Vermutung wird durch folgenden Befund gestützt: Der Reaktionsmischung wurde während der O_2 -Messung nach 5, 30 bzw. 60 min Kaliumferricyanid zugesetzt. Dabei wurde in keinem Fall ein Anstieg der O_2 -Konzentration registriert, der die Anwesenheit von HbO_2 angezeigt hätte.

2.2.3. Einfluß von Katalase

Um die Beteiligung von H_2O_2 an der hämoglobinkatalysierten Autoxidation von N-OH-4ClA zu untersuchen, wurde beim Verhältnis $\text{HbFe}^{3+}/\text{N-OH-4ClA} = 0,2$ die Veränderung der O_2 -Konzentration unter Zusatz von Katalase (200 U/ml) gemessen. Dabei wurde keine Abweichung gegenüber dem ursprünglichen Experiment beobachtet. Unter dem Einfluß von Katalase wurde außerdem die gleiche Veränderung des Spektrums im sichtbaren Bereich beobachtet wie sie in Abb. 11 gezeigt ist. Die Geschwindigkeit der HbFe^{3+} -Reduktion wird also durch die Anwesenheit von Katalase nicht verändert.

3. Versuche zur chemischen Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Zur Aufklärung der katalytischen Ferrihäoglobin-Bildung durch N-Arylaceto hydroxamsäuren wurden die Umwandlungsprodukte von N-OH-4-ClAA, die bei der Reaktion mit Oxyhäoglobin gebildet wurden, analysiert (4,1,). Um aus diesen Produkten Rückschlüsse auf die Art der Aktivierung der Hydroxam-

säure ziehen zu können, wurde auch die chemische Oxidation von N-OH-4ClAA untersucht. Da als katalytisch aktives Zwischenprodukt ein sekundäres Nitroxid in Frage kommt, wurde dieses Radikal durch chemische Oxidation erzeugt und sein Zerfall in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht.

3.1. Die Oxidation mit Bleidioxid in Benzol

Durch Versuche von Forrester et al.(1970) ist bekannt, daß sich N-Acetyl-N-arylnitroxide in organischen Lösungsmitteln durch Oxidation mit Silberoxid oder Nickelperoxid erzeugen lassen. In eigenen Vorversuchen gelang die quantitative Erzeugung der Radikale auch mit Kaliumpermanganat oder Bleidioxid. Um zu prüfen, ob die Zerfallsprodukte von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in einem ähnlichen Verhältnis entstehen wie die von Forrester bei der Oxidation von N-Hydroxy-acetanilid gefundenen Produkte, wurde eine $5 \cdot 10^{-3}$ molare Lösung von N-OH-4ClAA in Benzol mit PbO_2 oxidiert. Nach dem Abklingen der Reaktion, das sich spektroskopisch verfolgen ließ (Absorptionsmaximum des Radikals in Benzol: 440 nm) wurde das Reaktionsgemisch mit Hilfe der HPLC analysiert. Dabei wurden 38% 4-Chlornitrosobenzol, 33% N-Acetoxy-4-chloracetanilid, 10% 4-Chloracetanilid und 8% 4-Chlornitrosobenzol gefunden. Dieses Produktverhältnis stimmt weitgehend mit dem von Forrester gefundenen Produktmuster der Oxidation von N-OH-AA überein (35% Nitrosobenzol, 23% N-Acetoxy-acetanilid, 12% Acetanilid, 9% Nitrobenzol). Auf Grund dieser Produkte wurde von Forrester et al.(1970) ein Mechanismus für den Zerfall des Nitroxids postuliert, der in der Diskussion näher erörtert wird.

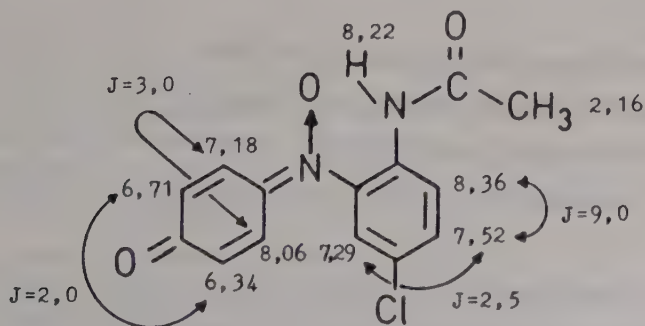
3.2. Die Oxidation mit Bleidioxid in Wasser

In Vorversuchen wurde beobachtet, daß das sekundäre Nitroxid in Wasser eine sehr viel geringere Lebensdauer besitzt als in organischen Lösungsmitteln. Die Stabilität des Radikals nimmt vermutlich mit zunehmender Polarität des Lösungsmittels ab. In Methanol erfolgt der Zerfall ca. 50 mal schneller als in Toluol (Riedl, 1983). In Wasser war die Lebensdauer jedoch zu gering für eine spektroskopische Bestimmung der Zerfallskinetik (mit der gleichen Meßanordnung). Um den Zerfall des Nitroxids in Wasser zu studieren, wurde daher das Radikal unter den gleichen Bedingungen wie bei der Oxidation in organischen Lösungsmitteln erzeugt und das Produktgemisch chromatographisch analysiert.

3.2.1. Reaktionsprodukte

10^{-2} mol (1,86 g) N-OH-4ClAA wurden in 1 l H_2O gelöst und mit 0,25 mol (60 g) PbO_2 gemischt. Nach fünfminütigem Rühren bei Raumtemperatur (in einem bedeckten Erlenmeyerkolben) wurde vom Bleidioxid abfiltriert. Das PbO_2 wurde mit ca. 50 ml H_2O ausgewaschen, das Filtrat auf vier 1 l Rundkolben verteilt und lyophilisiert. (Verluste an 4-Chlornitrosobenzol, die bei der Gefriertrocknung zu erwarten waren, wurden bewußt in Kauf genommen, da der Versuch zur qualitativen Analyse der Produkte dienen sollte.) Das Lyophilisat wurde mit 2 ml Methanol aufgenommen und auf Kieselgelplatten mit Chloroform-Methanol (98 : 2 v/v) chromatographiert. Nach 3-maliger Entwicklung von je 45 min waren neun Zonen voneinander getrennt. Fünf Zonen konnten mit Hilfe von Vergleichssubstanzen und auf

Grund der UV-Spektren identifiziert werden: Zone 3 ($R_F=0,26$): N-OH-4ClAA, $\lambda_{\max}=255$ nm; Zone 4 ($R_F=0,32$): 4-ClAA, $\lambda_{\max}=249$ nm; Zone 7 ($R_F=0,78$): N-Acetoxy-4-chloracetanilid, $\lambda_{\max}=252$ nm; Zone 8 ($R_F=0,89$): 4-Chlornitrobenzol, $\lambda_{\max}=270$ nm; Zone 9 ($R_F=0,94$): 4-Chlornitrosobenzol, $\lambda_{\max}=226, 288, 313$ nm. Die Zonen 1 ($R_F=0,11$), 2 ($R_F=0,14$) und 6 ($R_F=0,62$) enthielten nur sehr geringe Substanzmengen. Auch nach mehrmaliger Wiederholung des Oxidationsansatzes konnten keine zur Konstitutionsermittlung ausreichenden Mengen erhalten werden. Aus Zone 5 ($R_F=0,57$) wurden 5 mg einer bisher unbekannten Verbindung isoliert, die aus Diethylether-Hexan (10 : 1) in orangefarbenen Nadeln kristallisierte. Die Verbindung schmilzt unter Zersetzung bei 153-154 °C. Mit Hilfe der NMR-, IR-, UV- und Massenspektroskopie wurde die Verbindung als N-(2-Acetylamino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid identifiziert [CA-Nomenklatur: 1-(2-Acetamido-5-chlorphenylimino)-2,5-cyclohexadiene-1,4-dione-N-oxide]. Die Verbindung löst sich in Methanol, H_2O , $CHCl_3$, Diethylether und Benzol; sie ist unlöslich in Hexan. Das NMR-Spektrum in $CDCl_3$ bei 150 MHz ergab folgende Protonensignale (δ in ppm, Kopplungskonstanten J in Hz):



Das Signal des Amidprotons ($\delta = 8,22$ ppm) zeigt eine deutliche Verbreiterung. Das zur Amidgruppe benachbarte Proton ($\delta = 8,36$ ppm) verursacht infolge der Kopplung mit dem Amidproton ebenfalls ein etwas verbreitertes Signal.

Das UV-Spektrum (Abb. 13) zeigt Absorptionsmaxima bei 243 nm ($\epsilon = 10700$) und 370 nm ($\epsilon = 18000$). Ein ähnliches UV-Spektrum besitzt N-Phenyl-p-benzochinonimin-N-oxid, dessen Absorptionsmaxima bei 257 nm ($\epsilon = 3700$) und 371 nm ($\epsilon = 25000$) liegen (Pedersen, 1957), was für die Struktur eines p-Chinonaniloxids spricht.

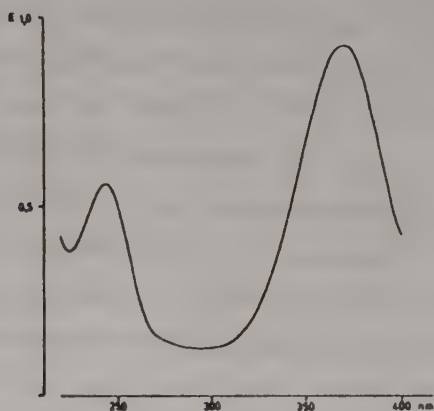


Abb. 13 UV-Spektrum von N-(2-Acetylamino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid in Methanol

Das UV-Spektrum zeigt bei Zusatz von Säure keine Verschiebung der Absorptionsmaxima, während Natriumhydroxid (2 Tropfen 2 M NaOH auf 3ml methanolische Lösung) irreversible Veränderungen des Spektrums bewirkt, die auf eine Zersetzung schließen lassen.

Im Infrarotspektrum (in KBr aufgenommen) treten Absorptionen bei 3300 und 3260 cm^{-1} auf, die für aromatische Acetamide charakteristisch sind. Außerdem ist zwischen 1200 und 1300 cm^{-1}

eine breite, intensive Bande zu beobachten, wie sie durch aromatische N-Oxide verursacht wird.

Daneben treten noch bei 1790, 1600, 1580, 1510, 1440 und 1370 cm^{-1} starke, aber wenig charakteristische Banden auf. Die Banden bei 800 und 840 cm^{-1} stehen in Einklang mit der Annahme eines unsymmetrisch trisubstituierten Benzolringes.

Im Massenspektrum wurde der Molekularpeak bei 290 (34) sowie folgende Fragmentationen gefunden (relative Intensitäten in Klammern): 274(8) -O; 248(22) - Keten; 232(26) - NHCOCH_3 ; 231(78) -Acetyl, -O; 203(100) - NHCOCH_3 , -20; 195(13) -O, -Cl, -Acetyl; 168(29) Abspaltung des chinoiden Systems; 154(11); 140(22); 105(31); 63(29); 43(82).

Das Isotopenverhältnis des Molekularpeaks und einiger Fragmentationenpeaks zeigt die Anwesenheit eines Chloratoms. Das Fragmentierungsmuster spricht außerdem für die Anwesenheit des Acetamido-Substituenten sowie das Vorliegen eines N-Oxids.

Die Elementaranalyse ergab 57,88% C und 3,86% H (berechnet 57,84% C, 3,81% H).

3.2.2. Die Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters

Der von Forrester et al. (1970) postulierte Zerfallsmechanismus von N-Acetyl-N-arylnitroxiden schließt eine Disproportionierungsreaktion ein, bei der eine Acetylgruppe auf den Nitroxidsauerstoff übertragen wird, so, daß das Nitrosoaren und das entsprechende N,O-Bisacetat gebildet werden. Um einen Hinweis auf den relativen Anteil dieser intermolekularen Reaktion zu erhalten, wurde die Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters bei der Oxidation von N-OH-4ClAA untersucht. Hierzu wurden 10^{-3} ,

10^{-4} und 10^{-5} molare wässrige Lösungen der Hydroxamsäure jeweils mit der 50-fachen molaren Menge an PbO_2 oxidiert und die Reaktionsprodukte mit Hilfe der HPLC analysiert. (Bei einer höheren Verdünnung als 10^{-5} mol/l war eine exakte quantitative Analyse nicht mehr möglich, da bei allen Konzentrierungsmethoden wie z.B. Extraktion oder Lyophilisation Verluste des flüchtigen Nitrosoarens auftreten.) Das Analysenergebnis ist in Tab. 2 zusammengestellt. Es zeigt, daß mit zunehmender Verdünnung der prozentuale Anteil an N-Acetoxy-4-chloracetanilid geringer, der Anteil an 4-Chlornitrosobenzol dagegen größer wird. Dieser Verdünnungseffekt beruht wahrscheinlich auf der Konkurrenz des Lösungsmittels um die elektrophile Acetylgruppe. Mit zunehmender Verdünnung wird außerdem weniger 4-Chloracetanilid gebildet, was ebenfalls für einen intermolekularen Entstehungsmechanismus dieses (formalen) Reduktionsproduktes spricht (siehe Diskussion S. 80).

N-Hydroxy-4-chloracetanilid	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	mol/l
4-Chlornitrosobenzol	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$	$7,7 \cdot 10^{-6}$	"
4-Chlornitrobenzol	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$0,4 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-6}$	"
N-Acetoxy-4-chloracetanilid	$3,5 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$0,5 \cdot 10^{-6}$	"
4-Chloracetanilid	$0,4 \cdot 10^{-4}$	$0,2 \cdot 10^{-5}$	$0,1 \cdot 10^{-6}$	"

Tab. 2: Die Reaktionsprodukte der Oxidation von N-OH-4ClAA mit PbO_2 in H_2O in Abhängigkeit von der ursprünglichen Konzentration an N-OH-4ClAA

3.3. Die Reaktion mit KO_2 in Dimethylsulfoxid

Der Bindungszustand von HbO_2 läßt sich durch folgende Grenzstrukturen beschreiben: $\text{HbFe}^{2+}\text{-O}_2 \longleftrightarrow \text{HbFe}^{3+}\text{-O}_2^{\cdot-}$ (Peisach et al., 1968; Weiss, 1964). Auf Grund dieser Polarisation der O_2 -Bindung konnte bei der Autoxidation von HbO_2 tatsächlich $\text{O}_2^{\cdot-}$ nachgewiesen werden (Misra u. Fridovich, 1972; Wever et al. 1973; Wallace et al. 1974; Gotoh u. Shikama, 1976; Goldberg u. Stern, 1977). Um zu prüfen, ob das Superoxid-Radikalanion bei der Kooxidation von N-OH-4ClAA mit HbO_2 als reaktives Zwischenprodukt in Frage kommt, wurde daher die Reaktion der Hydroxamsäure mit KO_2 untersucht. Hierzu wurden gleiche Volumenanteile einer $2 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung von N-OH-4ClAA und einer $5 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung von KO_2 in Dimethylsulfoxid gemischt und das Produktmuster mit Hilfe der HPLC analysiert. Nach einer Reaktionszeit von 5 min waren 81% der eingesetzten Hydroxamsäure zu 4-ClAA reduziert worden. Neben 1% an unverändertem N-OH-4ClAA wurde als einziges weiteres Reaktionsprodukt NO-4ClB zu 14% gefunden. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß $\text{O}_2^{\cdot-}$ gegenüber N-Arylacetohydroxamsäuren sowohl als Oxidationsmittel als auch als Reduktionsmittel wirkt, wobei der Reduktion eine größere Bedeutung zukommt.

3.4. Die Autoxidation von N-OH-4ClAA

Die Geschwindigkeit der Autoxidation von N-OH-4ClAA zeigt eine deutliche Abhängigkeit vom Lösungsmittel. Bei einer 10^{-3} molaren Lösung in Benzol wurde innerhalb von 24 Monaten (bei Raumtemperatur; in einem verschlossenen Gefäß) nur eine sehr geringe Autoxidation beobachtet, bei der 2% NO-4ClB und

1% 4-ClAA gebildet wurden.

In Diethylether (ebenfalls 10^{-3} mol/l; verschlossenes Gefäß; Raumtemperatur) war hingegen nach 6 Monaten eine deutliche Gelbfärbung der Lösung zu erkennen. Als Reaktionsprodukte wurden neben 22% unveränderter Hydroxamsäure 27% 4-ClAA, 26% NO-4ClB, 7% N-OAc-4-ClAA sowie 14% NO₂-4ClB gefunden. Mit ähnlicher Geschwindigkeit verlief die Autoxidation in H₂O. In einer 10^{-3} molaren Lösung waren nach 6 Monaten noch 8% N-OH-4ClAA vorhanden, wobei 35% 4-ClAA, 31% NO-4ClB, 19% NO₂-4ClB und 1% 4-ClA gebildet wurden. Die Tatsache, daß N-OAc-4ClAA nicht gefunden wurde, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf dessen spontane Zersetzung zurückzuführen. Auf Grund der Labilität der N-Acetoxy-Bindung gegenüber nucleophilem Angriff zerfällt die Verbindung in H₂O innerhalb weniger Stunden.

Insgesamt zeigt das Produktmuster der Autoxidation eine weitgehende Übereinstimmung mit dem Produktmuster der PbO₂-Oxidation. Bei der Autoxidation von N-OH-4ClAA kann daher ebenso wie bei der chemischen Oxidation die Beteiligung eines radikalischen Zwischenproduktes postuliert werden. Der beobachtete Lösungsmittelleffekt könnte ebenfalls als Hinweis auf diese Hypothese gedeutet werden, da N-Acetyl-N-arylnitroxide in Toluol ca. 50 mal langsamer zerfallen als in Methanol bzw. Diethylether (Riedl, 1983).

3.5. Der Zerfall von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Diethylether

Um den Zerfallsmechanismus des sekundären Nitroxids in einem organischen Lösungsmittel zu charakterisieren, wurde eine Lösung des Radikals in Diethylether durch Oxidation

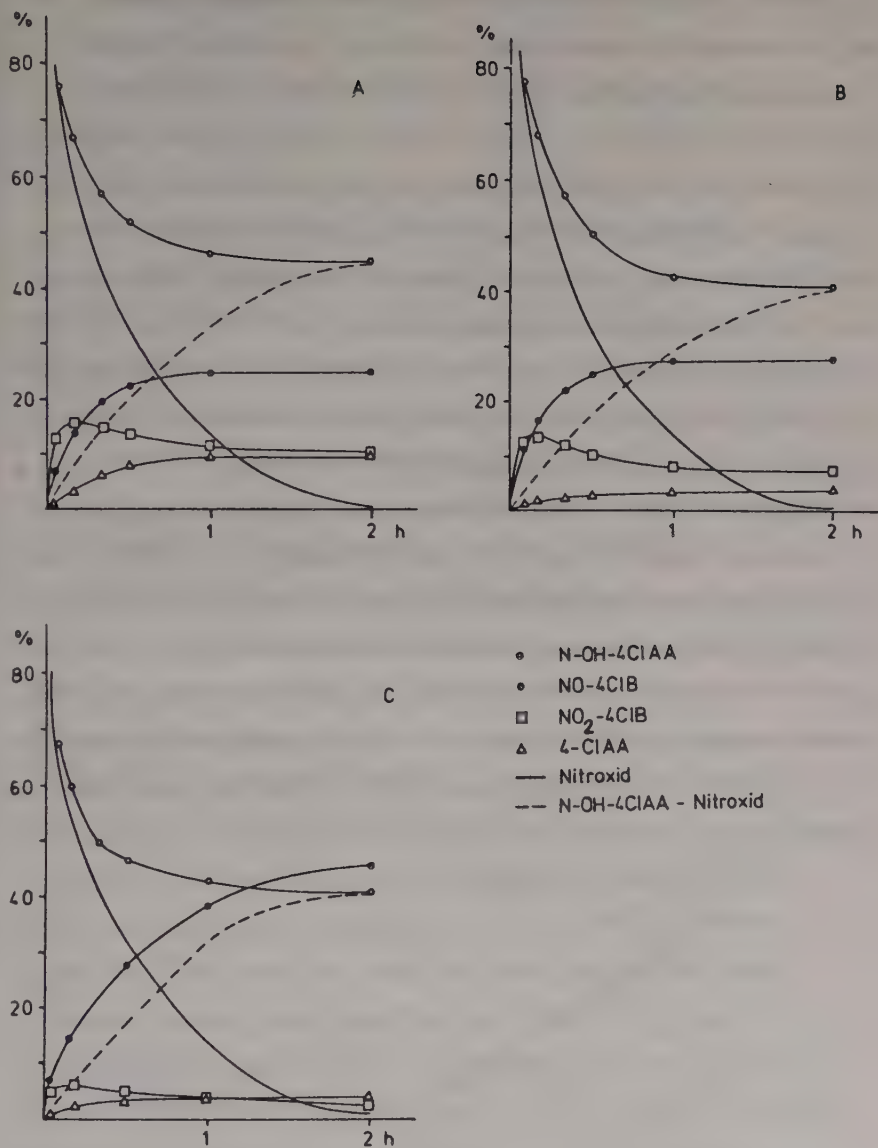


Abb. 14 Reaktionsprodukte beim Zerfall von 10^{-3} M N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Diethylether bei 25°C ; A : unter N_2 , B : an Luft, C : unter O_2 ;

mit Bleidioxid hergestellt und nach verschiedenen Zeiten mit Hilfe der HPLC analysiert. In der zur Analyse bestimmten Probe wurde das Radikal durch Zusatz von Hydrochinon zur Hydroxamsäure reduziert. (Eine direkte Analyse, ohne Reduktion des Nitroxids, war nicht möglich, da der Zerfall des Radikals auf der Trennsäule die Analyse stört.) Die Konzentration der Hydroxamsäure sollte daher als Maß für die aktuelle Konzentration des Radikals dienen. Da im Verlauf der Reaktion (auf Grund der Disproportionierung des Nitroxids) jedoch N-OH-4ClAA zurückgebildet wurde, gab die Analyse der Hydroxamsäure nicht den wahren Verlauf der Radikalkonzentration wieder. Der Zerfall des Nitroxids wurde daher spektroskopisch gemessen ($\lambda_{\max}$ von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Diethylether : 440 nm). Aus der Differenz der Radikalkonzentration und der durch Reduktion mit Hydrochinon erhaltenen Hydroxamsäure-Konzentration wurde die tatsächliche Rückbildung der Hydroxamsäure ermittelt (unterbrochene Linien in Abb. 14). Die Versuche wurden bei 25°C im geschlossenen System unter N₂, an Luft und unter O₂ durchgeführt.

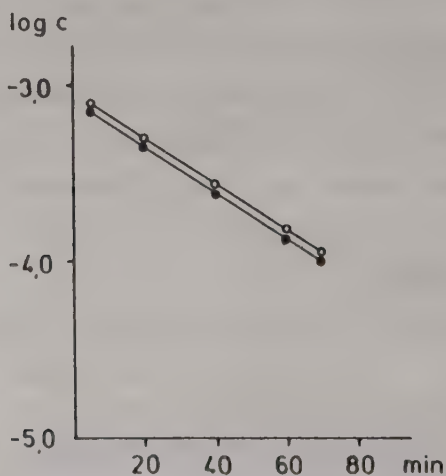


Abb. 15 Zerfallskinetik von N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Diethylether bei 25°C; ○ unter N₂; ● unter O₂;

Der Zerfall des Nitroxids folgt bei allen Versuchen (unter N_2 , an Luft und unter O_2) 70 Min. lang einem Zeitgesetz der ersten Ordnung (Abb. 15). Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $5,07 \cdot 10^{-4} s^{-1}$.

Außer den in Abb. 14 gezeigten Produkten wurden mit Hilfe der HPLC-Analyse noch 0,5% N-Acetoxy-4-chloracetanilid gefunden. (Die Konzentration dieser Verbindung blieb von 15 bis 120 min. im Rahmen der Meßgenauigkeit konstant.)

Mit Hilfe der Massenspektroskopie wurden außerdem noch geringe Mengen an Essigsäure, Chlorbenzol und Chlor-nitroacetophenon gefunden. (Auf Grund des Massenspektrums konnte nicht entschieden werden, ob letzteres als 2-Chlor-5-nitroacetophenon oder 3-Chlor-6-nitroacetophenon vorliegt.) Während die Kinetik des Radikalzerfalls durch die Anwesenheit von Sauerstoff nur in geringem Maß verändert wurde, zeigte die Analyse der Produkte einen deutlicheren Einfluß von Sauerstoff auf die Reaktion. Durch Sauerstoff wurde der Anteil des Nitrosoarens am Ende der Reaktion von 25% (unter N_2) auf 45% erhöht. Gleichzeitig sank die Maximalkonzentration des 4-Chlornitrobenzols, die 10 min nach Reaktionsbeginn beobachtet wurde, unter dem Einfluß von Sauerstoff von $1,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l auf $6 \cdot 10^{-5}$ mol/l ab. Bei der Reaktion unter Sauerstoff wurde außerdem weniger 4-Chloracetanilid gebildet (4%) als bei der Reaktion unter N_2 (10%). Die Rückbildung von N-Hydroxy-4-chloracetanilid erfolgte dagegen bei allen drei Versuchen mit nahezu gleicher Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der Disproportionierung des Nitroxids wurde also nicht durch Sauerstoff beeinflusst. Sauerstoff reagiert daher mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mit dem Nitroxid, sondern mit einem Spaltprodukt desselben.

3.6. Die Reaktion mit radiolytisch erzeugten Radikalen

In 10^{-4} molaren Lösungen von N-Hydroxy-4-chloracetanilid in 0,06 M Phosphatpuffer pH 7,4 wurden durch Wasserradiolyse Gesamtkonzentrationen von 10^{-4} bzw. 10^{-5} mol/l an verschiedenen Sauerstoffradikalen erzeugt (Bestrahlungsbedingungen siehe Methoden). Im Gegensatz zur chemischen Oxidation der Hydroxamsäure wurden unter dem Einfluß der radiolytisch generierten Radikale nur eine relativ geringe Umwandlung der Hydroxamsäure beobachtet. Hierbei wurden geringe Mengen von 4-Chloracetanilid und 4-Chlornitrosobenzol gebildet. Das Analyseergebnis ist in Tab. 3 dargestellt.

Radikal	c _{ges.} mol/l	N-OH-4-ClAA	4-ClAA	NO-4-ClB
$O_2^{\cdot}$	10^{-5}	98 %	0,2 %	-
$OH^{\cdot}$	10^{-5}	98 %	-	-
$O_2^{\cdot}/OH^{\cdot}$	10^{-5}	94 %	0,2 %	0,02 %
$e_{aq}^{-}, H^{\cdot}, CO_2^{\cdot}$	10^{-5}	98 %	2 %	-
$O_2^{\cdot}$	10^{-4}	96 %	2 %	0,4 %
$OH^{\cdot}$	10^{-4}	92 %	1 %	0,3 %
$O_2^{\cdot}/OH^{\cdot}$	10^{-4}	92 %	2 %	0,2 %
$e_{aq}^{-}, H^{\cdot}, CO_2^{\cdot}$	10^{-4}	78 %	20 %	-

Tab. 3 Reaktionsprodukte der Radiolyse von 10^{-4} M N-OH-4ClAA in 0,06 M Phosphatpuffer pH 7,4

Bei der Reaktion von N-OH-4ClAA mit äquimolaren Mengen an $O_2^{\cdot}$ - und $OH^{\cdot}$ - Radikalen blieb der größte Teil der Hydroxamsäure unverändert. Man muß daher annehmen, daß aus dem Primärprodukt

des radikalischen Angriffs die Hydroxamsäure spontan regeneriert werden kann. Im Gegensatz hierzu wurde durch ein Gemisch aus solvatisierten Elektronen und den reduzierenden Radikalen $H^\cdot$ bzw. $CO_2^\cdot$ 20% der Hydroxamsäure zu 4-Chloracetanilid reduziert. Das Fehlen anderer Reaktionsprodukte läßt vermuten, daß tatsächlich ein Reduktionsvorgang stattfindet. Bei der Reaktion mit $O_2^\cdot$ und $OH^\cdot$ wurde neben 4-ClAA auch 4-Chlornitrosobenzol gebildet. Die Tatsache, daß beide Produkte in ähnlicher Konzentration gefunden wurden, spricht dafür, daß das formale Reduktionsprodukt 4-ClAA in diesem Falle nicht durch einen tatsächlichen Reduktionsvorgang entsteht, sondern durch die Disproportionierung eines Zwischenproduktes gebildet wird.

4. Versuche mit Oxyhämoglobin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Um den Mechanismus der katalytischen Hämoglobin-Oxidation durch N-Arylaceto-hydroxamsäuren zu studieren, wurde vor allem die Reaktion zwischen gereinigtem Human-Hämoglobin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid untersucht, da diese Verbindung wegen ihrer Reaktivität am geeignetsten erschien. Außerdem konnte für N-OH-4ClAA und seine Reaktionsprodukte ein HPLC-Trennsystem ausgearbeitet werden, das eine rasche quantitative Analyse während der Reaktion mit Hämoglobin ermöglichte, was bei den anderen untersuchten Hydroxamsäuren (siehe 5.) bisher nicht gelang.

4.1. Zeitabhängige Analyse der Reaktionsprodukte

Bei der Reaktion von $10^{-3}M$ HbO_2 mit $10^{-3}M$ N-OH-4ClAA bei $25^\circ C$ wurden nach verschiedenen Zeiten die Reaktionsprodukte mit Hilfe

der HPLC analysiert. Synchron wurden die Ferrihämoglobin-Bildung nach der Cyanid-Methode und die Konzentration des gelösten Sauerstoffs mit der Clark'schen Sauerstoffelektrode gemessen. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur (25°C) untersucht.

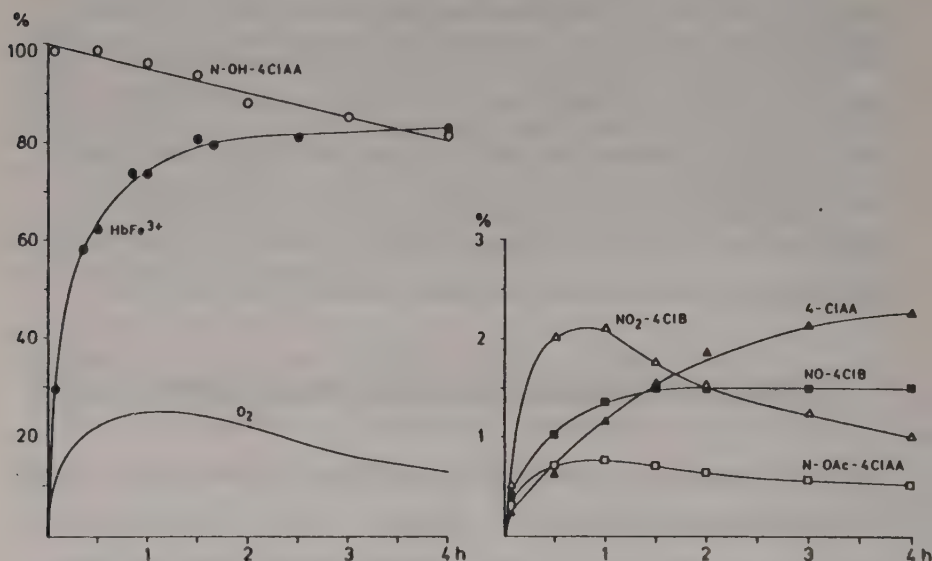


Abb. 16 Die Reaktion von 10^{-3} M HbO₂ mit 10^{-3} M N-OH-4ClAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 25°C;

Die Reaktion begann mit einer schnellen Bildung von HbFe³⁺, wobei keine Anlaufphase erkennbar war. Nach 1h lagen ca. 75% Ferrihämoglobin vor, wobei etwa ein Drittel der entsprechenden Sauerstoffmenge entbunden wurde. Zwei Drittel des gebundenen Sauerstoffs wurden folglich während 1h reduziert. Die Konzentration der Hydroxamsäure nahm im gleichen Zeitraum nur um etwa 5% ab, was ihre katalytische Funktion deutlich macht. Die Bildung der Reaktionsprodukte 4-Chlornitrosobenzol,

4-Chlornitrobenzol, 4-Chloracetanilid und N-Acetoxy-4-chloracetanilid erfolgte ebenso wie die Oxidation des Hämoglobins zum größten Teil in der Anfangsphase der Reaktion. Mit dem Gesamtverlauf der Ferrihämoglobin-Bildung korrelierte am besten die Kurve des 4-Chlornitrosobenzols. Ca. 50 min nach Reaktionsbeginn nahm die Konzentration von 4-Chlornitrobenzol sowie von N-Acetoxy-4-chloracetanilid wieder ab. Letzteres neigt auf Grund des elektrophilen Acylrestes zur Reaktion mit nucleophilen Agentien (z.B. SH-Gruppen von Globin) wowie zur Hydrolyse, was ein allmähliches Verschwinden aus dem Reaktionsgemisch erwarten läßt. Auf welche Weise 4-Chlor-nitrobenzol bei der Reaktion eliminiert wird, ist bisher unbekannt. Außer den in Abb. 16 gezeigten Verbindungen wurde das auf S. 43 - 45 beschriebene Chinonaniloxid, das bei der chemischen Oxidation der Hydroxamsäure entstanden war, in der Hämoglobininlösung

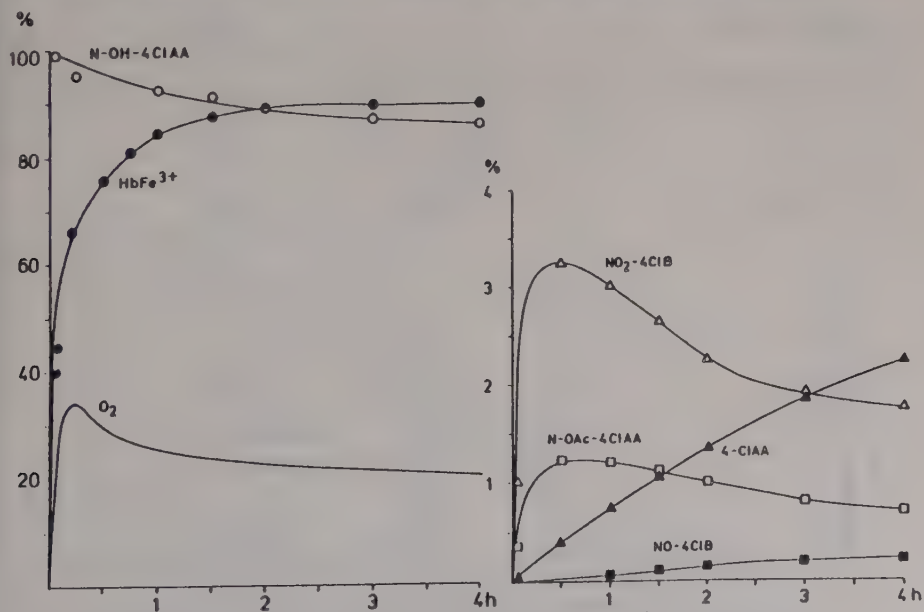


Abb. 17 Die Reaktion von 10^{-3} M HbO₂ mit $2 \cdot 10^{-3}$ M N-OH-4ClAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 25°C;

gefunden. Nach 30 min wurden ca. 0,3% und nach 60 min ca. 0,1% an N-(2-Acetylamino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid nachgewiesen. Von 90 min an war die Verbindung nicht mehr nachweisbar.

Abb. 17 zeigt eine Variation des vorhergehenden Experiments mit gleicher Hämoglobinkonzentration und doppelter Anfangskonzentration an N-OH-4ClAA ($2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$). Die Ferrihämoglobin-Bildung erfolgte erwartungsgemäß schneller als beim vorherigen Experiment. Die Maximalkonzentration an gelöstem Sauerstoff erreichte bereits nach 15 min ihr Maximum, gegenüber 60 min im vorhergehenden Versuch. Die zeitliche Veränderung der Reaktionsprodukte zeigt qualitativ deutliche Parallelen zum vorherigen Experiment. Auffällig ist die Tatsache, daß das Nitrosoaren in geringerer Konzentration auftrat und dafür mehr an $\text{NO}_2\text{-4ClB}$ gebildet wurde.

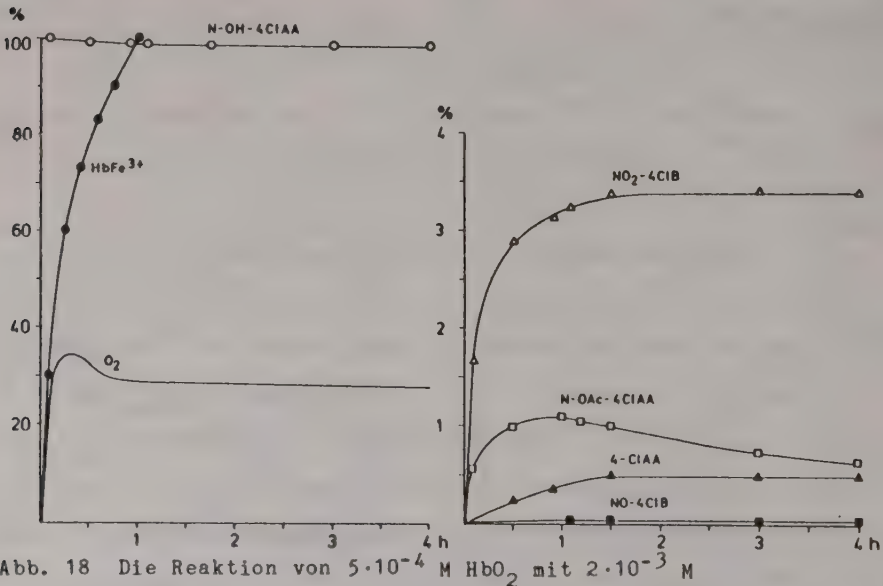


Abb. 18 Die Reaktion von $5 \cdot 10^{-4} \text{ M HbO}_2$ mit $2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

N-OH-4ClAA in 0.2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 25°C;

Entsprechend dieser Tendenz veränderte sich das Produktmuster, als der Überschuß an Hydroxamsäure weiter erhöht wurde. Abb. 18 zeigt die Reaktion bei 4-fachem Überschuß an N-OH-4ClAA. Die gebildete Menge an 4-Chlornitrobenzol überwiegt in diesem Fall noch deutlicher die Menge des Nitrosoarens. Nach ca. 1 h war Hämoglobin vollständig oxidiert. Erwartungsgemäß nahm die Konzentration von N-OH-4ClAA kaum mehr ab. Ebenso erfolgte nach 1 h keine Bildung von NO-4ClB, NO₂-4-ClB und 4-ClAA mehr. Der Zerfall des labilen N-Acetoxy-4-chloracetanilids schritt dagegen weiter fort. Die Konzentration von 4-Chlornitrobenzol nahm bei diesem Versuch, im Gegensatz zu den beiden vorhergehenden Experimenten, nicht wieder ab. Dieser Befund weist darauf hin, daß die bisher unbekannte Folgereaktion des Nitroarens im Zusammenhang mit der Ferrihämoglobin-Bildung steht.

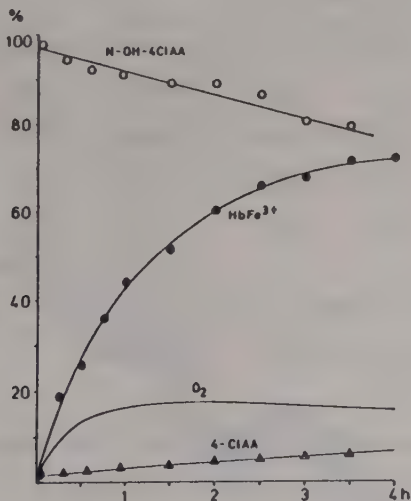


Abb. 19 Die Reaktion von 10^{-3} M HbO₂ mit $2 \cdot 10^{-4}$ M N-OH-4ClAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4 bei 25 °C;

Bei der Reaktion von 10^{-3} M Hämoglobin mit 0,2 Äquivalenten N-OH-4ClAA (pro mol Hb-Eisen) wird die katalytische Wirkung der Hydroxamsäure deutlich erkennbar. Nach 30 min wurden bei einem Verbrauch von $1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/l Hydroxamsäure 36 Äquivalente ($4,3 \cdot 10^{-4}$ mol/l) Hämoglobineisen oxidiert.

Bei allen Versuchen mit HbO_2 und N-OH-4ClAA wurde ein deutlich geringerer Anteil an Sauerstoff freigesetzt, als dem äquivalenten Anteil an HbFe^{3+} entsprochen hätte. Diese Differenz zeigt, daß ein erheblicher Teil des gebundenen Sauerstoffs während der Reaktion reduziert wurde. Tab. 4 gibt den pro mol Ferrihämoglobin-Eisen reduzierten Anteil an Sauerstoff bei den vorher beschriebenen 4 Experimenten wieder.

HbO_2 mol/l	N-OH-4ClAA mol/l	O_2 red. / HbFe^{3+}			
		15 min	30 min	60 min	120 min
10^{-3}	$2 \cdot 10^{-4}$	0,37	0,52	0,63	0,70
10^{-3}	10^{-3}	0,64	0,67	0,68	0,73
10^{-3}	$2 \cdot 10^{-3}$	0,52	0,60	0,69	0,74
$5 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-3}$	0,43	0,59	0,71	0,71

Tab. 4 Die Sauerstoffreduktion pro mol HbFe^{3+} bei der Reaktion von HbO_2 mit N-OH-4ClAA

Die Reduktion von Sauerstoff erfolgte bei allen Versuchen weitgehend parallel zur Bildung von HbFe^{3+} und war mit der vollständigen Oxidation von HbO_2 (Versuch in Abb. 19) beendet. Dieser Befund zeigt, daß der an Hämoglobin gebundene Sauerstoff im Sinne einer gekoppelten Oxidation -ähnlich wie bei der Reaktion von HbO_2 mit N-OH-4ClA- als Elektronenakzeptor fungiert, was durch die Ergebnisse 4.2. bestätigt wurde.

4.2. Spektroskopische Befunde

Bei der Reaktion von 10^{-3} M HbO_2 mit 10^{-3} M N-OH-4ClAA wurde die Veränderung des Absorptionsspektrums zwischen 500 und 700 nm aufgezeichnet. Dabei wurde ein kontinuierlicher Übergang des Oxyhämoglobin-Spektrums (λ_{max} : 540 und 576 nm) in das Spektrum von Ferrihämoglobin (λ_{max} : 497, 525, 561 und 630 nm) beobachtet. Isosbestische Punkte bei 521 und 588 nm zeigen, daß keine anderen Hämoglobinderivate als Zwischenprodukte an der Reaktion beteiligt sind.

Nach Zugabe von N-OH-4ClAA zu Desoxyhämoglobin konnte keine Veränderung des Spektrums festgestellt werden, was eine direkte Oxidation von Hämoglobin durch die Hydroxamsäure ausschließt.

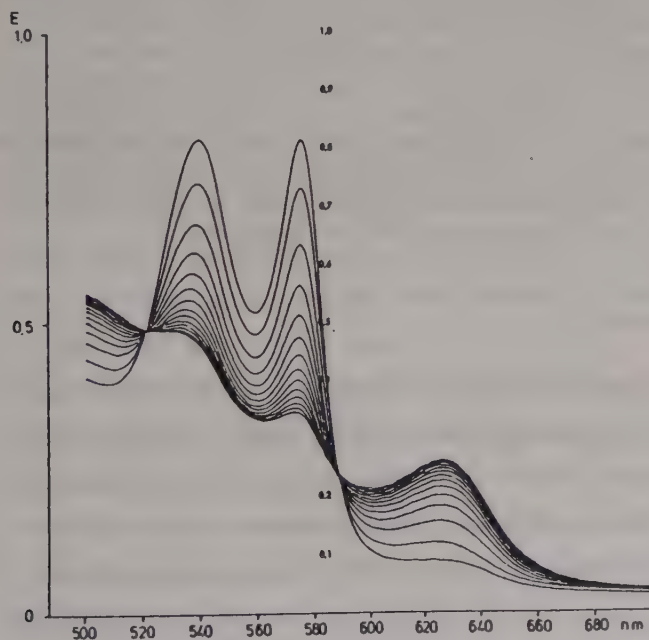


Abb. 20 10^{-3} M HbO_2 + 10^{-3} M N-OH-4ClAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4; Die Spektren wurden nach Verdünnung um den Faktor 1/30 alle 3 min aufgezeichnet.

4.3. Die Bedeutung von H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot}$

Bei der Reaktion von 10^{-3} M HbO_2 mit 10^{-3} M N-OH-4ClAA wurde unter Zusatz von 200 U/ml Katalase bzw. Superoxid-Dismutase die Ferrihämoglobin-Bildung sowie die Freisetzung von Sauerstoff gemessen. In beiden Fällen konnte keine Abweichung vom Kontrollexperiment nachgewiesen werden. Ebenso bewirkte der Zusatz von Katalase bzw. Superoxid-Dismutase 1 h nach Reaktionsbeginn keine Änderung des Reaktionsverlaufs und keine zusätzliche Freisetzung von Sauerstoff durch eventuell kumuliertes H_2O_2 .

Um die Bildung von $\text{O}_2^{\cdot}$ zu untersuchen, wurde die Reaktion unter Zusatz von 10^{-4} mol/l Nitroblau-tetrazoliumchlorid spektroskopisch verfolgt. Superoxid reduziert die Leukoform dieses Farbstoffs, der eine breite Absorptionsbande mit dem Maximum bei 561 nm besitzt. Im Zeitraum von 8 h, in dem die Ferrihämoglobin-Bildung vollständig zum Stillstand kam, wurde keine Extinktionserhöhung bei 561 nm beobachtet. Superoxid ist daher wahrscheinlich kein wichtiges Zwischenprodukt der Reaktion.

4.4. ESR-Spektroskopie

Zum Nachweis eventueller radikalischer Zwischenprodukte wurde die Reaktion von Oxyhämoglobin mit N-OH-4ClAA mit Hilfe der ESR-Spektroskopie untersucht. Da die Bildung der Oxidationsprodukte der Hydroxamsäure (4-Chlornitrosobenzol und 4-Chlornitrobenzol) vor allem in der schnellen Anfangsphase der Reaktion erfolgt, war auch die Entstehung des sekundären Nitroxids in dieser Phase der Reaktion zu erwarten. Um einerseits eine möglichst hohe Konzentration an N-OH-4ClAA, andererseits

aber eine möglichst lange Anfangsphase der Reaktion zu gewährleisten, wurde die Reaktion bei verschiedenen Molverhältnissen untersucht. Die Konzentration an HbO_2 betrug jeweils 10^{-3} mol/l, die Konzentration von N-OH-4ClAA $2 \cdot 10^{-4}$, $5 \cdot 10^{-4}$ und 10^{-3} mol/l. Bei keinem Experiment konnte ein Nitroxid oder ein anderes Radikal nachgewiesen werden. (Meßparameter: siehe Methoden).

4.5. Versuche mit Rindererythrozyten-Hämolysat

Um nach weiteren Reaktionsprodukten der Hydroxamsäure bei der Umsetzung mit HbO_2 zu suchen, wurde Rinder-Hämolysat verwendet, da dies in größerer Menge zur Verfügung stand als gereinigtes Human-Hämoglobin. 200 ml Hämolysat ($5 \cdot 10^{-3}$ mol/l) wurden mit einem Viertel Äquivalent N-OH-4ClAA (46,3 mg) gemischt und bei Raumtemperatur bis zur Beendigung der Ferrihämoglobin-Bildung (nach 60 min) in einem geschlossenen Gefäß gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit Diethylether und Ethylacetat extrahiert, das Lösungsmittel unter Kühlung der Vorlage abdestilliert und der Rückstand auf Kieselgelplatten mit Chloroform-Methanol (98:2 v/v) chromatographiert. Dabei wurden folgende Verbindungen auf Grund des UV-Spektrums identifiziert:

N-OH-4ClAA ($R_F=0,25$; $\lambda_{\max}=255$ nm), 4-ClAA ($R_F=0,32$; $\lambda_{\max}=270$ nm), N-OAc-4ClAA ($R_F=0,78$; $\lambda_{\max}=252$ nm), NO_2 -4ClB ($R_F=0,89$; $\lambda_{\max}=270\text{nm}$), NO-4ClB ($R_F=0,94$; $\lambda_{\max}=226, 288, 313$ nm) und N-(2-Acetylamino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid ($R_F=0,57$; $\lambda_{\max}=243, 370\text{nm}$). Im Destillat wurde als einzige flüchtige Komponente NO-4ClB gefunden.

5. Versuche mit HbO_2 und anderen N-Arylacetohydroxamsäuren

Um den Einfluß des Arylsubstituenten auf die Reaktivität von N-Arylacetohydroxamsäuren zu untersuchen, wurden bei der Reaktion von HbO_2 mit N-OH-AA, N-OH-4EAA und N-OH-3,4DClAA die Ferrihämoglobin-Bildung und synchron die Veränderung der Sauerstoffkonzentration gemessen. Die Reaktionsbedingungen waren jeweils die gleichen wie bei der Reaktion mit N-OH-4ClAA : 10^{-3} M HbO_2 ; 10^{-3} M Hydroxamsäure; 25°C . (Zeitabhängige Produktmusteranalysen konnten dabei nicht oder nur mit wesentlich geringerer Genauigkeit durchgeführt werden, da bisher keine geeigneten Trennsysteme zur Verfügung stehen.)

Die Geschwindigkeit der Ferrihämoglobin-Bildung war im Falle von N-Hydroxy-acetanilid deutlich geringer als bei der Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit HbO_2 (4.1.), woraus der aktivierende Einfluß des Chlorsubstituenten zu erkennen ist.

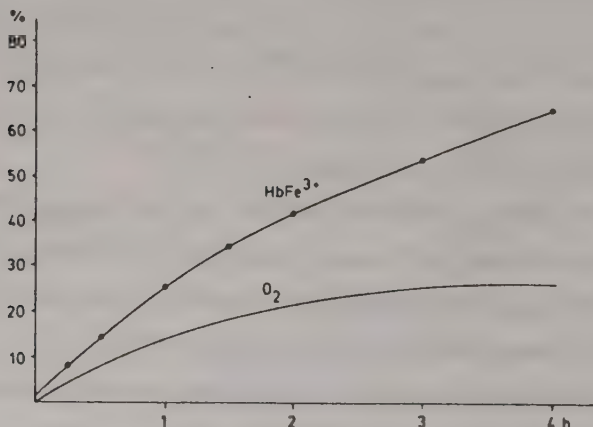


Abb. 21 10^{-3} M HbO_2 + 10^{-3} M N-OH-AA in 0,2 M Phosphatpuffer
pH 7,4; $T=25^\circ\text{C}$;

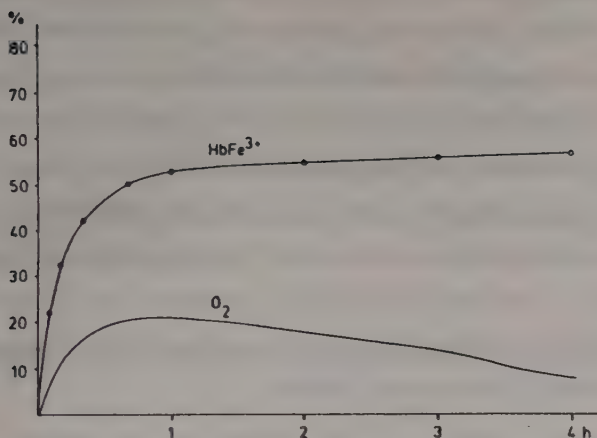


Abb. 22 10^{-3} M HbO_2 + 10^{-3} M N-OH-4EAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4; $T=25^\circ\text{C}$;

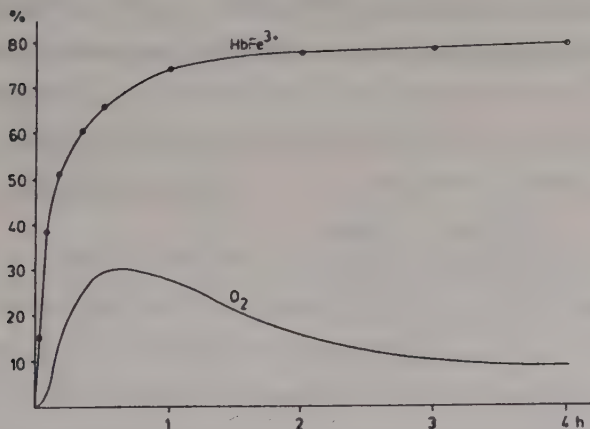


Abb. 23 10^{-3} M HbO_2 + 10^{-3} M N-OH-3,4DClAA in 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4; $T=25^\circ\text{C}$;

N-Hydroxy-phenacetin (N-Hydroxy-4-ethoxyacetanilid) reagierte ebenfalls langsamer als N-OH-4ClAA, jedoch schneller als die unsubstituierte Verbindung (N-OH-AA). Hieraus kann geschlossen werden, daß sowohl Elektronenakzeptor-Substituenten als auch Elektronen-Donatoren die katalytische Aktivität einer N-Aryl-

acetohydroxamsäure erhöhen können. Die Ferrihämoglobin-Bildung durch N-OH-3,4DC1AA erfolgte mit nahezu der gleichen Geschwindigkeit wie bei N-OH-4ClAA. Auch die Veränderung der O_2 -Konzentration zeigt einen sehr ähnlichen Verlauf, wobei lediglich das Maximum der O_2 -Kurve bei N-OH-3,4DC1AA etwas früher (35 min) als bei N-OH-4ClAA (ca. 70 min) erreicht wurde. Die Einführung eines zweiten Chlorsubstituenten in meta-Stellung zum aktiven Zentrum (N-Atom) bewirkt also keine ausgeprägte Erhöhung der katalytischen Aktivität, was in Einklang mit der allgemeinen Deutung der Substituenteneffekte an Aromaten steht.

6. pK_a -Werte verschiedener N-Arylacetohydroxamsäuren

Um zu prüfen, ob bei N-Arylacetohydroxamsäuren ein Zusammenhang zwischen der katalytischen Aktivität und der Säurestärke besteht, wurden die pK_a -Werte von N-OH-AA, N-OH-4ClAA, N-OH-3,4DC1AA und N-OH-4EAA nach der auf S. 22 beschriebenen Methode bestimmt. Dabei wurden folgende Werte erhalten:

N-OH-AA	:	$pK_a = 8,32 \pm 0,04$
N-OH-4ClAA	:	$pK_a = 8,47 \pm 0,03$
N-OH-3,4DC1AA	:	$pK_a = 8,25 \pm 0,04$
N-OH-4EAA	:	$pK_a = 8,70 \pm 0,05$

Die angegebene Schwankungsbreite ist die Standardabweichung von 14 Meßwerten (2 Messungen mit jeweils 7 Einzelwerten).

Für die pK_a -Werte von N-OH-4ClAA, N-OH-3,4DC1AA und N-OH-4EAA waren keine Angaben in der Literatur zu finden. Für N-OH-AA wurden dagegen zwei Werte publiziert, die auf Grund der unterschiedlichen Meßtemperatur voneinander abweichen: 8,10 (30°C) (Dutt & Seshadri, 1967) und $8,34 \pm 0,02$ (25°C) (Monzyk & Crumbliss, 1980). Der gemessene Wert von 8,32 liegt somit nahe

an dem von Monzyk & Crumbliss (1980) ermittelten Wert. Der pK_a -Wert von N-OH-4EAA ist erwartungsgemäß höher als der von N-OH-AA, da der Elektronendonator-Effekt der Ethoxygruppe die Basizität am Sauerstoffatom erhöht und daher die Säurestärke erniedrigt. Umgekehrt bewirkt ein Chloratom am aromatischen Ring eine Erniedrigung der Elektronendichte am Sauerstoffatom und damit eine Erhöhung der Säurestärke.

7. Versuche mit Ferrihämoglobin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Um zu prüfen, ob Ferrihämoglobin die Reaktion von N-OH-4ClAA mit Oxyhämoglobin beeinflusst, wurde auch die Reaktion von N-OH-4ClAA mit gereinigtem Ferrihämoglobin untersucht. Dabei interessierte vor allem die Frage, ob $HbFe^{3+}$ eine Aktivierung der Hydroxamsäure oder aber eine Verminderung ihrer katalytischen Aktivität bewirken kann.

7.1. Reaktionsprodukte

Bei der Reaktion von 10^{-3} M Ferrihämoglobin mit 10^{-3} M N-OH-4ClAA bei Raumtemperatur wurde innerhalb von 4h eine langsame, lineare Abnahme der Hydroxamsäure-Konzentration auf ca. 97% beobachtet. Gleichzeitig wurden 2,2% 4-ClAA und 0,5% NO-4ClB gebildet. Weitere Reaktionsprodukte konnten nicht nachgewiesen werden. Die Reaktion von $5 \cdot 10^{-3}$ M N-OH-4ClAA mit 10^{-3} M Ferrihämoglobin ergab nach 4h ein nahezu identisches Produktmuster: 97% N-OH-4ClAA, 2,0% 4-ClAA und 0,5% NO-4ClB.

Die Wiederholung der Experimente unter Kohlenmonoxid ergab in beiden Fällen (10^{-3} und $5 \cdot 10^{-3}$ M N-OH-4ClAA) einen noch langsameren Verbrauch der Hydroxamsäure, wobei im Zeitraum von 4h nur jeweils 1% 4-ClAA gebildet wurde.

7.2. Die Reduktion von Ferrihämoglobin

Bei der Reaktion von 10^{-3} M Ferrihämoglobin mit 10^{-3} M N-OH-4ClAA unter Kohlenmonoxid wurden in 4h bei Raumtemperatur 6% CO-Hämoglobin gebildet. (Die Bestimmung erfolgte durch Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$, wobei die Extinktionserniedrigung bei 567 nm gemessen wurde. Unabhängig davon ergab die Cyanid-Methode das gleiche Ergebnis.)

Unter dem Einfluß von Luftsauerstoff wurden im gleichen Zeitraum 8% Oxyhämoglobin gebildet. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Cyanid-Methode und aufgrund der O_2 -Freisetzung nach Oxidation mit $K_3Fe(CN)_6$, die mit der Sauerstoffelektrode gemessen wurde.

7.3. Sauerstoffaufnahme

Mit Hilfe der Sauerstoffelektrode wurde bei der Reaktion von Ferrihämoglobin mit N-OH-4ClAA (je 10^{-3} M) ein langsamer Verbrauch von gelöstem Sauerstoff gemessen. Die O_2 -Utilisierung erfolgte über 4h hinweg mit einer konstanten Geschwindigkeit von $33 \mu\text{mol/h}$. Bei gleicher Hämoglobin-Konzentration und 5-facher Konzentration von N-OH-4ClAA erfolgte die Sauerstoffaufnahme im Beobachtungszeitraum von 4h mit $37 \mu\text{mol/h}$.

Nach Zugabe von $2 \cdot 10^{-3}$ M N-OH-4ClAA zu 10^{-3} M Ferrihämoglobin betrug die Geschwindigkeit $29 \mu\text{mol/h}$.

In einer Lösung von $2 \cdot 10^{-3}$ M $HbFe^{3+}$ und 10^{-3} M N-OH-4ClAA wurden $8 \mu\text{mol } O_2$ pro h verbraucht.

Man erkennt hieraus, daß die O_2 -Utilisierung in größerem Maße von der Hämoglobin-Konzentration als von der Konzentration an N-OH-4ClAA abhängt.

7.4. Der Einfluß von H_2O_2

Nach Zusatz einer äquimolaren Menge von H_2O_2 zu einer 10^{-3} molaren Lösung von Ferrihämoglobin wurde im Spektrum eine Extinktionserhöhung bei 540 und 585 nm beobachtet, die nach Keilin und Hartree (1950) auf die Bildung eines H_2O_2 -Adduktes " $HbFe^{3+}-OOH$ " zurückzuführen ist. Dieser Komplex zersetzte sich innerhalb von ca. 3h unter Bildung von Oxyhämoglobin. (Das Absorptionsmaximum bei 585 nm verlagerte sich dabei nach 576 nm.) Unmittelbar nach der Bildung des H_2O_2 -Adduktes wurden 10^{-3} M N-OH-4ClAA hinzugegeben. Dabei wurde der H_2O_2 -Komplex innerhalb 1h vollständig zu Ferrihämoglobin zersetzt. Bei der Analyse des Reaktionsgemisches mit Hilfe der HPLC wurden neben 92% an N-OH-4ClAA 2% 4ClAA und 4% NO-4ClB gefunden.

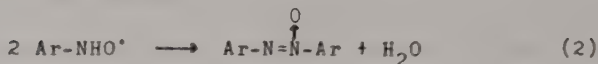
DISKUSSION

1. Die Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

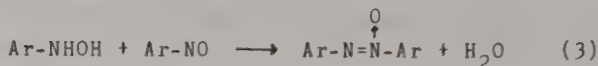
Die in Abb. 3, S.24 dargestellte Analyse der Autoxidation von N-OH-4ClA läßt sich in folgender Weise deuten: Die Konzentration von NO-4ClB erreicht ebenso wie die des primären Nitroxids nach 12 - 15 min ein Maximum, was darauf hinweist, daß sowohl die Bildung als auch der Zerfall dieser beiden Produkte in wechselseitiger Beziehung stehen. Als Ursache für diese Korrelation kommt vor allem die Gleichgewichtsreaktion



in Frage, die von Ogata et al. (1964) bei der Autoxidation von Phenylhydroxylamin in Methanol postuliert wurde und von Bowman et al. (1971) in Benzol mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen wurde. Die Bildung von Azoxybenzol wurde von den genannten Autoren sowohl der Dimerisierung des Nitroxids unter nachfolgender Wasserabspaltung



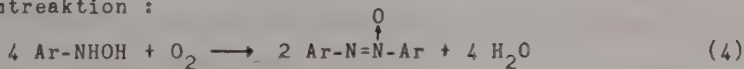
als auch der Kondensation



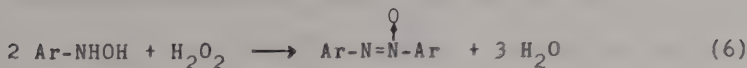
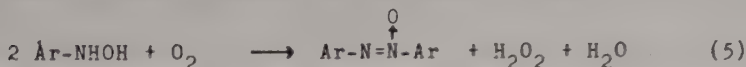
zugeschrieben. Über die relativen Anteile der beiden Reaktionen konnten bisher keine Aussagen gemacht werden, da die Einstellung des Gleichgewichts (1) in organischen Lösungsmitteln sehr schnell erfolgt und daher keine zeitliche Differenz zwischen beiden Vorgängen beobachtet wird. Wie man aus Abb. 3 erkennt,

erfolgt die Bildung von Bisazoxychlorbenzol auch im wässrigen System zeitgleich zur Abnahme von N-OH-4ClA, aber auch zum Zerfall des primären Nitroxids. Auch hier kann daher keine unmittelbare Entscheidung über die Anteile der Reaktionen (2) und (3) getroffen werden. Während die Gesamtreaktion nach einem Zeitgesetz der zweiten Ordnung verläuft – bezüglich N-OH-4ClA und O₂ jeweils nach erster Ordnung – konnte für den Zerfall des Nitroxids sowie für die Bildung von Bisazoxychlorbenzol keine ganzzahlige Reaktionsordnung gefunden werden. Hieraus kann man schließen, daß Bisazoxychlorbenzol gleichzeitig durch die Reaktionen (2) und (3) gebildet wird.

Bei der vollständigen Autoxidation einer 10⁻³ molaren Lösung von N-OH-4ClA sank die O₂-Konzentration von 278 μmol/l auf 15 μmol/l, wobei neben 2% NO₂-4ClB nahezu quantitativ Bisazoxychlorbenzol gebildet wurde. Hieraus ergibt sich folgende Stöchiometrie der Gesamtreaktion :



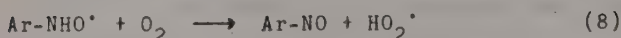
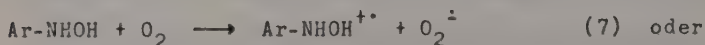
Die gleiche Stöchiometrie der Reaktion wurde auch von Ogata et al. (1964) bei der Autoxidation von Phenylhydroxylamin in Methanol gefunden, wobei folgende Teilreaktionen formuliert wurden :



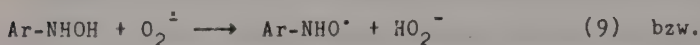
Da während der Reaktion kein H₂O₂ gefunden wurde und auch Katalase keinen Einfluß auf die Kinetik des Sauerstoffverbrauchs zeigte, muß die Reaktion (6) – falls H₂O₂ überhaupt als Zwischenprodukt gebildet wird – mit wesentlich höherer Geschwindigkeit als Reaktion (5) ablaufen.

Als geschwindigkeitsbestimmender Teilschritt von Reaktion (5)

kommt auf Grund der Kinetik 2.Ordnung ein bimolekularer Prozeß, wie z.B.



in Frage, an den sich die schnelle Folgereaktion



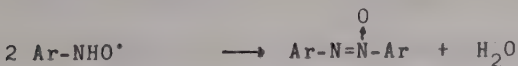
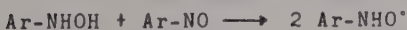
anschließen könnte. Da die Konzentration des Nitroxids erst nach ca. 12 min ihr Maximum erreicht, bestimmt vermutlich Reaktion (7) die Kinetik. Diese Reaktion könnte somit die rasche Bildung des Nitroxids in der Anfangsphase der Reaktion erklären. Die Tatsache, daß Superoxid-Dismutase keinen Einfluß auf die Reaktionskinetik ausübt, weist darauf hin, daß die hypothetische Folgereaktion (9) keinen wesentlichen Beitrag zur Gesamtreaktion leistet. Auf Grund der spontanen Disproportionierung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu O_2 und H_2O_2 kommt daher vermutlich der Reaktion (6) eine größere Bedeutung zu.

Da die absolute Konzentration des Nitroxids nicht bestimmt werden konnte, war es auch nicht möglich zu entscheiden, ob zu Beginn der Reaktion NO-4ClB oder das Nitroxid schneller gebildet wird, d.h., ob die Bildung des Nitroxids einen Primärprozeß der Autoxidation darstellt. In diesem Zusammenhang gibt der Vergleich mit den Ergebnissen von Mulvey und Waters (1978) einen wichtigen Hinweis. Bei der Disproportionierung von Phenylhydroxylamin zu Anilin, Nitrosobenzol und Azoxybenzol wurde ein sehr ähnlicher Konzentrationsverlauf des Nitroxids beobachtet, wie er in Abb.3 gezeigt ist. Die Reaktion wurde jedoch unter Ausschluß von Sauerstoff und mit katalytischen Mengen $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ in 30% t-Butylalkohol untersucht. Auch der Konzentrationsverlauf von Nitroso-

benzol und Azoxybenzol zeigten deutliche Parallelen zu den Ergebnissen in Abb. 3 (Maximum von Nitrosobenzol : 9% nach 30 min; maximaler Anstieg von Azoxybenzol nach 30 min; nach 2h 10% Azoxybenzol;).

Die schnelle Bildung des Nitroxids ist also nicht an die Oxidation des Arylhydroxylamins durch O_2 gebunden. Die Ähnlichkeit der beiden Reaktionen könnte durch das Gleichgewicht (1) erklärt werden, das in beiden Fällen eine geringe stationäre Nitroxid-Konzentration erzeugt, die über die Reaktionen (2) und (3) zur Bildung der Azoxyverbindung führt. Der Unterschied zwischen beiden Reaktionen bestünde demnach darin, daß bei der Autoxidation O_2 als Elektronenakzeptor fungiert, während bei der Disproportionierung Anilin gebildet wird.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse und unter Berücksichtigung der zitierten Arbeiten kommen für den Mechanismus der Autoxidation von N-OH-4ClA folgende Reaktionen in Betracht :



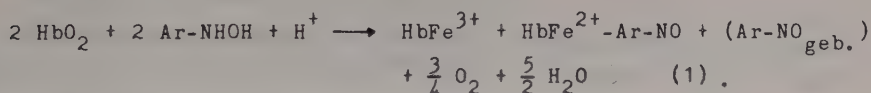
Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen von Mulvey und Waters(1978) kann geschlossen werden, daß die leichte Autoxidierbarkeit von Arylhydroxylaminen mit der Labilität dieser Oxidationsstufe gegenüber Disproportionierung zusammenhängt.

Da sowohl bei der Disproportionierung als auch bei der Autoxidation radikalische Zwischenprodukte auftreten, wird verständlich, daß beide Reaktionen durch Übergangsmetallionen katalysiert werden.

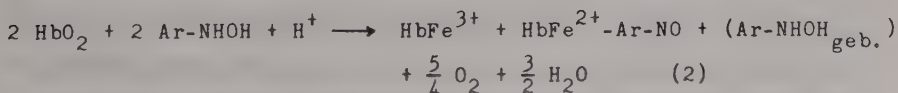
2. Die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloranilin mit Oxyhämoglobin

Nach Zusatz einer äquimolaren Menge N-OH-4ClA zu 10^{-3} M HbO₂ wurden innerhalb von 3 min 50% Ferrihämoglobin, 46% des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes sowie 2,2% freies NO-4ClB gebildet (Abb. 7). Über 50% der eingesetzten Menge N-OH-4ClA waren also nach 3 min nicht mehr nachweisbar, was vermutlich auf eine kovalente Bindung an das Protein zurückzuführen ist. Kiese und Taeger (1976) fanden eine Bindung von ¹⁴C-markiertem Phenylhydroxylamin an verschiedene SH-Gruppen – besonders häufig an Cystein β 93 – sowie an andere bisher noch unbekannte Positionen. In welcher Form das Arylhydroxylamin gebunden wird, konnte auf Grund der Labilität der Bindung nicht geklärt werden. Daher ist auch nicht bekannt, ob das Arylhydroxylamin selbst oder eines seiner Oxidationsprodukte für die Bindung verantwortlich ist. Die Ergebnisse in Abb. 7 zeigen, daß das Massendefizit nicht nur während der initialen Phase der gekoppelten Oxidation, sondern auch in der zweiten Phase der Reaktion – in der vorwiegend die Zersetzung des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes erfolgt – rasch zunahm. Beim Zerfall des Komplexes wird also das Nitrosoaren vom Häm-Eisen gelöst und gleichzeitig an das Globin-Gerüst gebunden. Dabei entsteht ein – vermutlich strukturell modifiziertes – Desoxyhämoglobin, dessen Konzentrationsverlauf wahrscheinlich durch die (mit HbFe²⁺ bezeichnete) unterbrochene Linie in Abb. 7

wiedergegeben wird. Für die Interpretation dieser Kurve als Desoxyhämoglobin spricht auch die langsame Rückbildung von Oxyhämoglobin, die parallel zur Bildung von "HbFe²⁺" erfolgt. Da das Schicksal des Arylhydroxylamins noch nicht vollständig geklärt ist, läßt sich auch die Stöchiometrie der gekoppelten Oxidation bisher nicht exakt bestimmen. Aus dem gleichen Grund ist auch die Interpretation der Sauerstoffmessungen nur unter vereinfachenden Annahmen möglich. Nimmt man an, daß das Arylhydroxylamin primär vollständig zum Nitrosoaren oxidiert wird und legt das nach 3 min erhaltene Analysenergebnis zugrunde, so ergibt sich folgende formale Reaktionsgleichung:



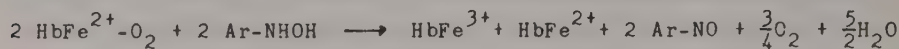
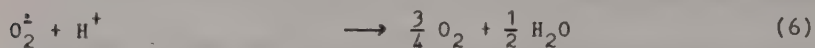
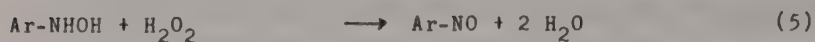
Nach dieser Stöchiometrie sollten $\frac{3}{8}$ (37,5%) des ursprünglich gebundenen Hämoglobin-Sauerstoffs freigesetzt werden, was mit dem gemessenen Wert von 34% relativ gut übereinstimmt. Nimmt man dagegen an, daß das Arylhydroxylamin ohne vorherige Oxidation an den Globin-Teil des Proteins gebunden wird, so ergibt sich die formale Gleichung



wonach $\frac{5}{8}$ (62,5%) des Hämoglobin-Sauerstoffs freigesetzt werden sollten. Bei beiden Reaktionsgleichungen wurde eine vollständige Reduktion von Sauerstoff zu H₂O, ohne Anreicherung von H₂O₂ oder O₂[•] vorausgesetzt, was auch auf Grund der Ergebnisse 2.1.6. sinnvoll erscheint. Außerdem wurde angenommen, daß bei der Bindung von N-OH-4ClA bzw. NO-4ClB an Hämoglobin kein Sauerstoff verbraucht oder freigesetzt wird. Aus diesem Vergleich kann da-

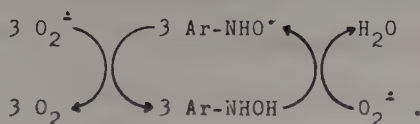
her indirekt geschlossen werden, daß die Bindung von N-OH-4ClA an Hämoglobin wahrscheinlich erst nach der Oxidation zum Nitrosoaren erfolgt.

Zur Deutung der formalen Reaktionsgleichung (1) wird folgender Mechanismus vorgeschlagen:



Reaktion (3) steht in Einklang mit der Beobachtung, daß die Reaktion von N-OH-4ClA mit HbO_2 nach dem Zeitgesetz der 2. Ordnung verläuft (Sterzl, 1984). Dabei wird angenommen, daß die Reaktion (3) die Geschwindigkeit bestimmt. Reaktion (4) ist vermutlich durch die rasche Stabilisierung von HbFe^{2+} als Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex begünstigt. Für einen synchronen Ablauf der Reaktionen (3) und (4) spricht auch der Befund, daß der Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex mit derselben Geschwindigkeit gebildet wurde, wie Ferrihämoglobin. Da H_2O_2 bisher nicht als Zwischenprodukt gefunden wurde, wird angenommen, daß die Reaktion (5) sehr schnell abläuft. Daher wurde auch die Disproportionierung von Superoxid (6) ohne die Zwischenstufe H_2O_2 formuliert. Möglicherweise wird die Disproportionierung von H_2O_2 und damit auch die Reaktion (6) durch das Arylhydroxylamin oder das primäre Nitroxid katalysiert, da auch bei der Autoxidation von N-OH-4ClA kein H_2O_2 gebildet wurde. Auf Grund dieser Annahme

wird für die Reaktion (6) folgender Mechanismus postuliert:



Die Reduktion von Ferrihämoglobin, die nur im abgeschlossenen System (der O_2 Meßzelle) zwischen 3 und 5 min beobachtet wurde (Abb.7), läßt sich bisher nicht eindeutig erklären. Als Reduktionsmittel kommt vor allem N-OH-4ClA in Frage. Obwohl die Verbindung nach 3 min im Reaktionsgemisch nicht mehr nachweisbar war, könnte sie auf Grund des Gleichgewichts



in geringem Umfang regeneriert werden. Für diese Hypothese spricht die Tatsache, daß die Radikalkonzentration im Zeitraum zwischen 3 und 15 min noch deutlich höher war als im anschließenden langsamen Reaktionsabschnitt. Nach den Befunden von Kiese und Reinwein (1950) kann Ferrihämoglobin durch Phenylhydroxylamin tatsächlich reduziert werden. Dies konnte durch das unter 2.2.2. beschriebene Experiment auch für N-OH-4ClA bestätigt werden. Die Beobachtung, daß die Reduktion von Ferrihämoglobin nur im geschlossenen System erfolgt, könnte durch das begrenzte Sauerstoffangebot in der initialen Reaktionsphase erklärt werden. Der entscheidende Unterschied wäre hierbei die Verzögerung der (an die Ferrihämoglobin-Bildung gekoppelten) Autoxidation von N-OH-4ClA im geschlossenen Reaktionsraum. Der beobachtete Sauerstoffüberdruck nach 3 min spricht nicht gegen diese Erklärung, da die gekoppelte Oxidation zu diesem Zeitpunkt bereits zum Stillstand gekommen ist.

Wie aus Abb.7 hervorgeht, war während der gesamten Reaktion die Konzentration des primären Nitroxids ca. zweimal so groß wie im Kontrollexperiment (ohne Hb). Hieraus läßt sich schließen, daß sowohl bei der gekoppelten Oxidation als auch beim Zerfall des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes das Nitroxid gebildet wird.

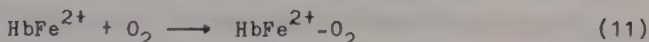
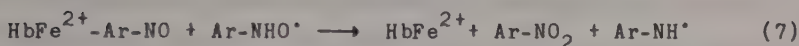
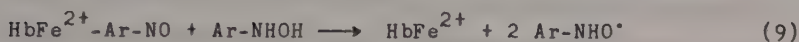
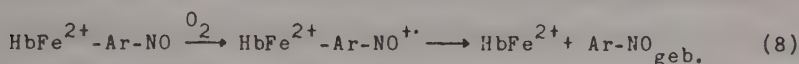
Beim Zerfall des Komplexes wurde pro Äquivalent $\text{HbFe}^{2+}\text{-Ar-NO}$ ca. 1 mol Sauerstoff verbraucht. Die Kinetik 2. Ordnung kann daher als Reaktion von jeweils 1. Ordnung bezüglich Sauerstoff und bezüglich des Komplexes gedeutet werden. Da bei der Reaktion kein Ferrihämoglobin, sondern äquimolare Mengen von Oxyhämoglobin und Desoxyhämoglobin gebildet wurden, handelt es sich weder um eine Oxidation des Komplexes noch um einen reinen Ligandenaustausch (O_2 gegen NO-4ClB). Da der Sauerstoffverbrauch bei der Zersetzung des Komplexes ca. zweimal so groß war wie der Rückbildung von HbO_2 entsprochen hätte und außerdem nur eine sehr geringe Menge 4-Chlornitrobenzol gebildet wurde, muß eine bisher unbekannte, latente Oxidationsreaktion postuliert werden. Hierfür kommt vor allem eine partielle Oxidation des Komplexes im Frage, wobei z.B. die Bildung eines Nitrosoaren-Radikalkations – als Übergangszustand oder Zwischenprodukt – die rasche kovalente Bindung des Nitrosoarens an das Protein erklären könnte.

Zeitgleich zum Zerfall des Komplexes erfolgt die Bildung von 4-Chlornitrobenzol und 4-Chloranilin. Der auffallend parallele Konzentrationsverlauf dieser beiden Produkte sowie das annähernd konstante molare Verhältnis von 2 : 1 ($\text{NO}_2\text{-4ClA}$ zu 4-ClA) weist außerdem darauf hin, daß ihrer Bildung eine gemeinsame Ursache zugrunde liegt. Mit dem relativ geringen Anteil beider Produkte vereinbar wäre z.B. ein Angriff des Nitroxids auf das gebundene Nitrosoaren,



wobei ein Teil des resultierenden Aminyls an das Protein binden könnte, während der Rest unter Elektronenaufnahme zum Amin weiterreagiert. Freies NO-4ClB reagiert mit dem Nitroxid vermutlich nicht in gleicher Weise, da bei der Autoxidation von N-OH-4ClA, bei der das Nitroxid und das Nitrosoaren im Gleichgewicht vorliegen, kein 4-Chloranilin gebildet wird.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse werden für den Zerfall des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes folgende Reaktionen vorgeschlagen:



Die Reaktionsfolge (9)-(10) könnte sowohl die rasche Bildung von Desoxyhämoglobin als auch die erhöhte stationäre Nitroxid-Konzentration erklären, da die Reaktion (9) mit der Autoxidation des Arylhydroxylamins konkurrieren und dadurch den Zerfall des Nitroxids verlangsamen würde. Für diese Hypothese spricht außerdem die zwischen 3 und 5 min beobachtete Reduktion von Ferrihämoglobin, die auf eine Rückbildung von N-OH-4ClA in situ schließen läßt. In dieser Phase der Reaktion könnte das Nitrosoaren durch die Bindung an Hämoglobin kontinuierlich aus dem Gleichgewicht (10) entfernt werden und somit die Rückbildung von N-OH-4ClA und damit auch die Reduktion von HbFe^{3+} bewirken.

3. Die hämoglobinkatalysierte Autoxidation von N-Hydroxy-4-chloranilin

Die Beschleunigung der Autoxidation von Phenylhydroxylamin durch Hämoglobin wurde von Heubner, Meier und Rhode (1923) entdeckt und von Kiese und v. Ruckteschell (1951) mit Hilfe manometrischer Messungen untersucht. Da dieser Effekt für die Aufklärung der Ko-oxidation von Hämoglobin mit Arylhydroxylaminen von zentraler Bedeutung ist, wurde er hier mit N-OH-4ClA untersucht. Dabei sollte einerseits geprüft werden, ob sich Unterschiede zwischen der manometrischen und der elektrochemischen Sauerstoffmessung nachweisen lassen. Andererseits war der Vergleich der beiden Arylhydroxylamine sowie die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Kiese & v. Ruckteschell auf andere Reaktionsbedingungen von Interesse. Diese Untersuchungen wurden nämlich bei pH 5,8 sowie mit einer 42 mal höheren Konzentration von Phenylhydroxylamin ($2,1 \cdot 10^{-2}$ M) durchgeführt.

In Abb. 10 ist der Einfluß von Oxyhämoglobin und Ferrihämoglobin auf die Autoxidation einer $5 \cdot 10^{-4}$ molaren Lösung von N-OH-4ClA gezeigt. Sowohl für HbO_2 als auch für HbFe^{3+} ergab sich – in Übereinstimmung mit Kieses Befunden – eine Proportionalität zwischen der Hämoglobin-Konzentration und der initialen Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme. Die beschleunigende Wirkung von Hämoglobin wurde von Kiese mit $6 \cdot 10^{-2} \text{ mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Äquivalente}^{-1}$ angegeben. Aus der Steigung der Geraden für HbFe^{3+} in Abb. 10 wurde ein entsprechender Wert von $6,96 \cdot 10^{-2} \text{ mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Äquivalente}^{-1}$ ermittelt. Hieraus erkennt man, daß Hämoglobin die Autoxidation von N-OH-4ClA etwas stärker beschleunigt als die Autoxidation von Phenylhydroxylamin. Die katalytische Wirkung von Oxyhämoglobin war mit $2,24 \cdot 10^{-1} \text{ mol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{Äquivalente}^{-1}$ ca. 1,8 mal so groß wie die Wirkung von Ferrihämoglobin. Auch dieser Befund steht in Einklang mit den Ergebnissen der manometrischen Messungen von

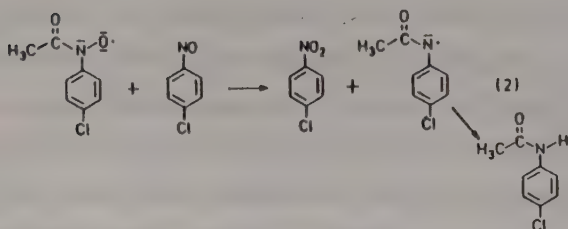
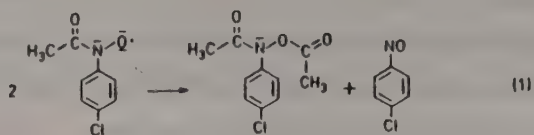
Kiese und v. Ruckteschell (1951), die bei niedrigen Hämoglobinkonzentrationen ebenfalls eine ca. doppelt so große katalytische Wirkung von HbO_2 fanden. Dieser Unterschied weist darauf hin, daß die katalytische Aktivität von Ferrihämoglobin auf der anfänglichen Reduktion zu Ferrohämoglobin beruht und daß dieser Prozeß die Geschwindigkeit der katalytischen Reaktion bestimmt.

Aus dem Vergleich von Abb. 11 mit den Ergebnissen 2.1.7. wird deutlich, daß die Reduktion von Ferrihämoglobin tatsächlich wesentlich langsamer ist als die gekoppelte Oxidation von HbO_2 mit N-OH-4ClA . Da man für einen katalytischen Zyklus einen wiederholten Wertigkeitswechsel von Hämoglobin-Eisen annehmen muß, ist die Reduktion von HbFe^{3+} sowohl bei den Versuchen mit HbO_2 als auch bei denen mit HbFe^{3+} ein limitierender Faktor. Der Mechanismus der Katalyse läßt sich zur Zeit nicht formulieren, da weder die gekoppelte Oxidation noch deren komplexe Folgereaktionen im einzelnen geklärt sind. Da bei der Reaktion von N-OH-4ClA sowohl mit HbFe^{3+} (2.2.2.) als auch mit HbO_2 (Abb. 7) rasch der Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex gebildet wird, könnte auch dieser bei der Katalyse eine Rolle spielen. Weiterhin ungeklärt ist u.a., in welcher Weise die Katalyse durch die Bindung von Sauerstoff an Desoxyhämoglobin limitiert wird und ob die kovalente Bindung des Nitrosoarens an Hämoglobin dessen Sauerstoffaffinität verändert.

4. Autoxidation und chemische Oxidation von N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Forrester et al. (1970) fanden bei der Oxidation von N-Acetylphenylhydroxylamin mit Ag_2O in Benzol Nitrosobenzol, N-Acetoxyacetanilid, Acetanilid und Nitrobenzol. Ein analoges Produktmuster wurde auch bei der Oxidation von N-Hydroxy-4-acetylaminobiphenyl gefunden. Aus dem Verhältnis der Reaktionsprodukte

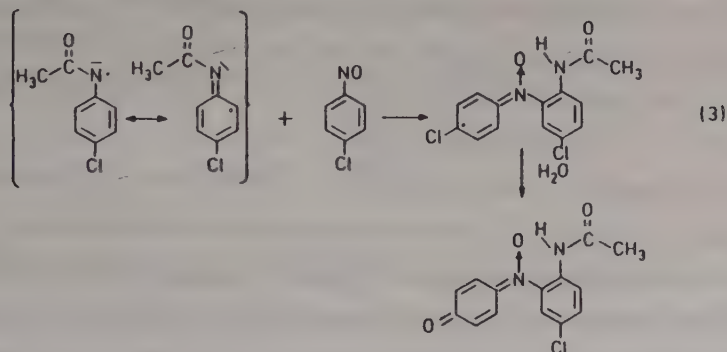
wurde geschlossen, daß die Hydroxamsäure zum N-Acetyl-aryl-nitroxid oxidiert wird und daß dieses in folgender Weise zerfällt:



Reaktion (1) wurde auch von Bartsch et al. (1971) am Beispiel von N-Hydroxy-2-acetylaminofluoren beschrieben, wobei in CH_2Cl_2 eine Kinetik 2. Ordnung gefunden wurde, die für einen bimolekularen Mechanismus spricht. Die gleiche Reaktionskinetik wurde auch beim Zerfall von N-Acetyl-phenylnitroxid, N-Acetyl-2-phenanthrylnitroxid und N-Acetyl-4-biphenylnitroxid in Toluol und Methanol beobachtet, wobei der Zerfall in Methanol ca. 50 mal schneller war als in Toluol (Riedl, 1983). N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid zerfiel dagegen nur in Toluol nach dem Zeitgesetz der 2. Ordnung.

Um zu prüfen, ob der von Forrester et al. postulierte Mechanismus auch für die Oxidation von N-OH-4ClAA zutrifft, wurde ein analoges Experiment mit PbO_2 in Benzol durchgeführt, wobei eine klare Übereinstimmung im Produktmuster beobachtet wurde (3.1.). Die Oxidation von N-OH-4ClAA mit PbO_2 in H_2O verlief so schnell, daß die Kinetik (ohne Einsatz von stopped-flow-Methoden) nicht bestimmt werden konnte. Da jedoch die gleichen Reaktionsprodukte wie bei der Oxidation in Benzol gefunden wurden (NO -4ClB, N-OAc-4ClAA, 4ClAA und NO_2 -4ClB), muß man annehmen, daß auch hier das

Nitroxid als Zwischenprodukt gebildet wird und die Produkte durch die Reaktionen (1) und (2) entstehen. Für diese Annahme spricht außerdem die Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters (3.2.2.), da diese einen intermolekularen Mechanismus für die Bildung aller vier Produkte wahrscheinlich macht. Bei der Oxidation von N-OH-4ClAA in H_2O wurde als weiteres Reaktionsprodukt das auf S.43 beschriebene p-Chinonaniloxid gefunden, dessen Bildung als weiteres Indiz für den obigen Mechanismus gelten kann. In Ergänzung zu den Reaktionen (1) und (2) wird folgende Bildungsweise von N-(2-Acetyl-amino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid postuliert:



Für eine solche Reaktion spricht die Tatsache, daß Nitrosoarene sehr gute Radikalfänger sind und daher häufig für spin-trapping-Experimente verwendet werden. Aus dem Befund, daß auch bei der Autoxidation von N-OH-4ClAA in Diethylether (3.4.) alle vier Endprodukte der Reaktionen (1) und (2) gebildet wurden, kann man schließen, daß auch hier das sekundäre Nitroxid als Zwischenstufe auftritt. Die Einelektronen-Oxidation der Hydroxamsäure durch molekularen Sauerstoff ist auf Grund der thermodynamischen Gegebenheiten wahrscheinlich, da das Redoxpotential dieser Reaktion bei + 610 mV liegt, während das Potential für den Übergang des zweiten Elektrons + 960 mV beträgt (Riedl, 1983).

Das Redoxpotential der vollständigen Reduktion von O_2 zu H_2O liegt bei + 800 mV (James, 1978).

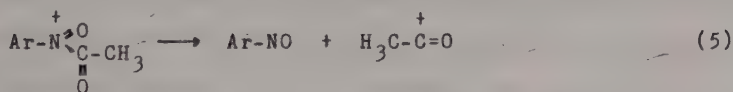
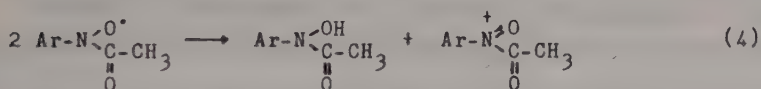
Bei der Reaktion von N-OH-4ClAA mit den radiolytisch generierten Radikalen $O_2^{\cdot -}$ und $OH^{\cdot}$ wurde eine relativ geringe Umsetzung der Hydroxamsäure beobachtet (3.6.). Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß unter den Bedingungen der kontinuierlichen Radiolyse die stationäre Nitroxid-Konzentration nur sehr niedrig war. Das hat zur Folge, daß die Rückbildung der Hydroxamsäure aus dem Nitroxid durch spontane Elektronenaufnahme (vom Lösungsmittel) gegenüber der bimolekularen Reaktion (1) begünstigt wird. Diese Annahme stützt sich einerseits auf das hohe Oxidationspotential des Einelektronenübergangs (+ 610 mV), andererseits auf die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters bei der Oxidation von N-OH-4ClAA mit PbO_2 in H_2O (3.2.2.). Ein weiterer Hinweis für die obige Deutung ergibt sich aus der Beobachtung, daß die Hydroxamsäure durch reduzierende Radikale – solvatisierte Elektronen, $H^{\cdot}$ und $CO_2^{\cdot -}$ – in wesentlich höherem Maße umgesetzt wurde als durch Superoxid und OH-Radikale. Da hierbei eine tatsächliche Reduktion der Hydroxamsäure zu 4-ClAA erfolgte, erklärt sich der höhere Umsatz der Hydroxamsäure aus der Tatsache, daß hier keine bimolekulare Reaktion beteiligt ist. Daher wurde bei der Einwirkung der reduzierenden Radikale auf N-OH-4ClAA auch keine Konzentrationsabhängigkeit des Produktmusters beobachtet (1/10 Äquivalent der Radikale erzeugt 2% 4-ClAA, 1 Äquivalent entsprechend 20% 4-ClAA.).

Die Ergebnisse der Radiolyse-Experimente unterstreichen somit, daß auch in H_2O der bimolekulare Zerfallsmechanismus des Nitroxids gültig ist.

Eine Reduktion der Hydroxamsäure zu 4-ClAA wurde auch mit KO_2 in Dimethylsulfoxid beobachtet (3.3.). Da hierbei auch NO-4ClB gebildet wurde, wirkt $O_2^{\cdot -}$ unter diesen Bedingungen sowohl

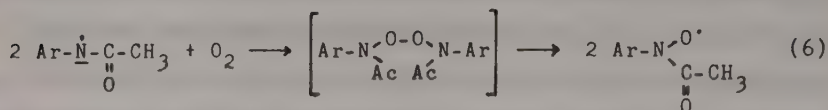
oxidierend als auch reduzierend. Im Gegensatz dazu wurde bei der Reaktion mit radiolytisch erzeugtem $O_2^{\cdot -}$ nur sehr wenig 4-ClAA gebildet, woraus man schließen kann, daß die Reaktivität und das Redoxverhalten von $O_2^{\cdot -}$ vom Lösungsmittel abhängen.

Bei der Untersuchung der Oxidation von N-OH-4ClAA in Diethylether (3.5.) zeigte sich, daß auch hier das Nitroxid gebildet wird. Sein Zerfall erfolgte jedoch unerwartet nach einem Zeitgesetz der 1. Ordnung. Daher muß in diesem Fall ein bisher unbekannter Zerfallsmechanismus postuliert werden. Da in 2h 41% (unter O_2) bzw. 46% (unter N_2) N-OH-4ClAA zurückgebildet wurden, ist es naheliegend, eine Disproportionierung des Nitroxids anzunehmen:



Für diesen Mechanismus spricht auch die zeitliche Entwicklung der übrigen Reaktionsprodukte. 4-Chlornitrosobenzol entsteht annähernd synchron zur Bildung von N-OH-4ClAA sowie zum Zerfall des Nitroxids. Auf Grund der schnellen Bildung des Nitrosoarens kann das Nitroxid jedoch mit diesem gemäß Reaktion (2) reagieren, was die ebenfalls rasch einsetzende Bildung von 4-Chlornitrosobenzol und 4-Chloracetanilid sowie den gegenüber N-OH-4ClAA geringeren Anteil an NO-4ClB erklärt. Für eine Abspaltung des Acylrestes als Acyl-Kation spricht, daß im Reaktionsgemisch neben Essigsäure auch ein am aromatischen Ring acetyliertes 4-Chlornitrosobenzol (Chlor-nitroacetophenon) gefunden wurde. Vermutlich hängt die Abnahme der NO₂-4ClB-Konzentration mit der Entstehung dieses Produktes zusammen, was bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte.

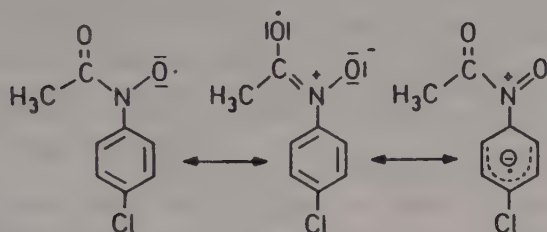
Aus dem Befund, daß die Anwesenheit von Sauerstoff keine grundlegende Änderung des Reaktionsablaufs bewirkt, wird geschlossen, daß nicht das Nitroxid mit O_2 reagiert, sondern vermutlich ein Folgeprodukt. Nimmt man an, daß das aus Reaktion (6) resultierende sekundäre Aminyl-Radikal mit Sauerstoff reagiert, so könnte eine kontinuierliche Regenerierung des Nitroxids erfolgen:



Hiermit könnte man erklären, daß unter dem Einfluß von Sauerstoff deutlich weniger 4-Chloracetanilid gebildet wird als unter N_2 . Außerdem wäre damit verständlich, warum der Anteil an NO-4ClB - entgegen der Erwartung - mit zunehmender O_2 -Konzentration ansteigt. Eine Regenerierung des Nitroxids nach Reaktion (6) würde nämlich einen höheren Anteil der Reaktion (4) und damit insgesamt eine vermehrte Bildung von NO-4ClB bewirken. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese ist die Kinetik der Reaktion. Obwohl unter O_2 die gleiche Reaktionsordnung wie unter N_2 beobachtet wurde, ist der Zerfall des Nitroxids unter dem Einfluß von Sauerstoff - ebenfalls unerwartet - etwas verzögert. Als Ursache käme eine Mitwirkung der Reaktion (6) in Frage, falls diese eine höhere Geschwindigkeitskonstante als die Reaktion (1) besitzt. Um die genannten Hypothesen über den Einfluß von Sauerstoff zu prüfen, ist also eine Reihe von weiteren Experimenten notwendig.

Die Bildung von lediglich 0,5% N-Acetoxy-4-chloracetanilid zeigt, daß die Disproportionierung des Nitroxids in Diethylether die Hauptreaktion darstellt und nur in geringem Maße von Reaktion (1) begleitet ist. Für die Beobachtung, daß das Nitroxid in Diethylether nach einem anderen Mechanismus zer-

fällt als in Benzol bzw. Toluol, kann bisher keine eindeutige Erklärung gegeben werden. Vermutlich wird durch die Polarität des Ethermoleküls der Übergangszustand der Reaktion (4) stabilisiert. Andererseits könnten im polaren Lösungsmittel die polaren Grenzstrukturen des Nitroxids in stärkerem Maße beteiligt sein:



Aus den ESR-Spektren von Nitroxiden gibt es Hinweise darauf, daß die Polarität des Radikals durch die Polarität des Lösungsmittels bestimmt wird (Aurich et al., 1977).

5. Die Reaktion von N-Hydroxy-4-chloracetanilid mit Oxyhämoglobin

Bei der Reaktion von N-OH-4ClAA mit gereinigtem Oxyhämoglobin (4.1.) wurde bei allen Experimenten eine rasche Ferrihämoglobin-Bildung beobachtet, bei der ein Teil des an HbO_2 gebundenen Sauerstoffs reduziert wurde. In Abwesenheit von Sauerstoff wurde dagegen keine Reaktion zwischen der Hydroxamsäure und Hämoglobin beobachtet. Als eigentliches Oxidationsmittel wirkt also der an Hb gebundene Sauerstoff, auf den die Hydroxamsäure in einem katalytischen Zyklus Elektronen überträgt. Die katalytische Funktion der Hydroxamsäure war auf Grund ihrer geringen Umwandlung deutlich zu erkennen. Als Reaktionsprodukte wurden 4-Chlornitrosobenzol, 4-Chlornitrobenzol, 4-Chloracetanilid

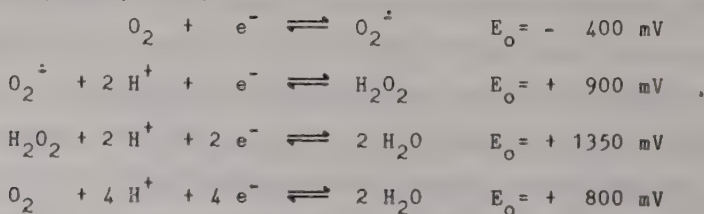
N-Acetoxy-4-chloracetanilid und N-(2-Acetylamino-5-chlorphenyl)-p-benzochinonimin-N-oxid identifiziert. Da bei der Reaktion mit HbO_2 die gleichen Produkte gefunden wurden wie bei der chemischen Einelektronen-Oxidation in H_2O , muß man annehmen, daß N-Acetyl-4-chlorphenylnitroxid in Gegenwart von Oxyhämoglobin gebildet wird. Diese Annahme wird vor allem durch die Entstehung von N-OAc-4ClAA gestützt, da seine Bildung die wichtigste Zerfallsreaktion des Nitroxids in H_2O darstellt. Die Tatsache, daß alle Umwandlungsprodukte der Hydroxamsäure vor allem in der schnellen Anfangsphase der Reaktion gebildet wurden, läßt vermuten, daß die stationäre Konzentration des Nitroxids in dieser Zeit relativ hoch war. Da in dieser Phase auch die Ferrihämoglobin-Bildung am schnellsten war, ist das Nitroxid mit hoher Wahrscheinlichkeit am postulierten Zyklus der Hämoglobin-Oxidation beteiligt.

Wie die Ergebnisse 3.4. zeigen, kann bereits durch Einwirkung von molekularem Sauerstoff auf N-OH-4ClAA das Nitroxid entstehen. Damit wird verständlich, daß der an Hämoglobin gebundene Sauerstoff besonders leicht mit der Hydroxamsäure reagiert, da er gegenüber freiem Sauerstoff aktiviert ist. Die Aktivierung läßt sich auf die Polarisierung der Eisen-Sauerstoff-Bindung zurückführen, die sich mit Hilfe der Grenzstrukturen



beschreiben läßt (Weiss, 1964; Peisach et al., 1968).

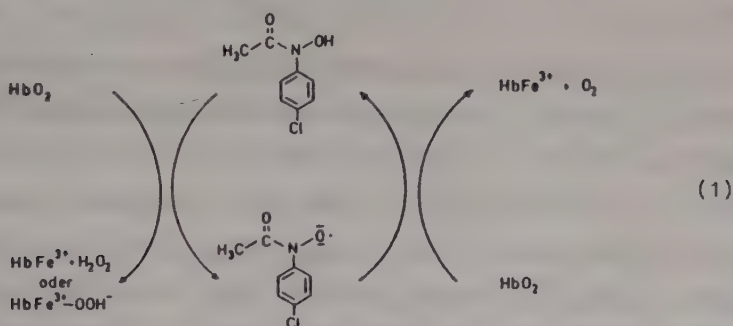
Aus dem Vergleich der Redoxpotentiale verschiedener Sauerstoffspezies (James, 1978)



(bei pH 7 und 25°C)

erkennt man, daß nur die Übertragung des ersten Elektrons auf molekularen Sauerstoff eine endergonische Reaktion ist, während die weitere Reduktion mit einem Energiegewinn verbunden ist. Damit wird einerseits die relative Reaktionsträgheit von molekularem Sauerstoff verständlich und andererseits läßt sich damit erklären, daß der – im Sinne einer superoxidischen Grenzstruktur – polarisierte Bindungszustand des Hämoglobin-Sauerstoffs eine beträchtliche Erhöhung der Reaktivität bewirkt.

Für die katalytische Ferrihämoglobin-Bildung wird daher folgender Mechanismus angenommen :

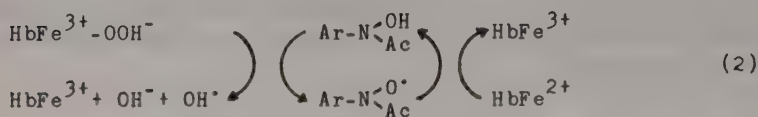


Das Halbstufenpotential des Redoxpaares $\text{HbFe}^{2+}/\text{HbFe}^{3+}$ liegt bei + 125 mV (Antonini et al., 1964), das von N-OH-4ClAA/sek.Nitroxid dagegen bei + 610 mV (Riedl, 1983). Die Regenerierung der Hydroxamsäure unter gleichzeitiger Oxidation von Hämoglobin ist daher aus thermodynamischer Sicht wahrscheinlich.

Im obigen Schema wurde die Bildung des Ferrihämoglobin- H_2O_2 -Komplexes postuliert (Keilin und Hartree, 1950), da die Übertragung von zwei Elektronen auf das Sauerstoffmolekül gegenüber dem Einelektronen-Transfer energetisch begünstigt ist. Diese Formulierung steht in Einklang mit der Beobachtung, daß mit Hilfe von Nitroblau-tetrazoliumchlorid kein freies Superoxid nachgewiesen werden konnte und auch Superoxid-Dismutase keinen Einfluß

auf den Reaktionsablauf hatte (4.3.).

Da auch Katalase weder die Sauerstoff-Freisetzung noch die Ferrihämoglobin-Bildung beeinflusste, wird angenommen, daß kein freies H_2O_2 gebildet wurde, sondern der $\text{HbFe}^{3+}\text{-H}_2\text{O}_2$ -Komplex. Daß dieser Komplex bei der spektroskopischen Untersuchung der Reaktion nicht als Zwischenprodukt gefunden wurde, beruht vermutlich auf seiner raschen Zersetzung, die in folgender Weise ablaufen könnte :



Für diese Reaktion spricht die Beobachtung, daß der Ferrihämoglobin- H_2O_2 -Komplex in Gegenwart von N-OH-4ClAA zu HbFe^{3+} zersetzt wird (7.4.), wobei geringe Mengen von 4-Chlornitrosobenzol und 4-Chloracetanilid entstehen. In Abwesenheit von Hydroxamsäure und mit einem geringen Überschuß an H_2O_2 wandelt sich der Komplex in Oxyhämoglobin um. Eine Zersetzung durch HbFe^{2+} , d.h. ohne die katalytische Wirkung der Hydroxamsäure, ist daher auszuschließen. Als Alternative zur Reaktionsfolge (2) käme eine oxidative Zersetzung des Komplexes in Frage. Da im Falle einer univalenten Oxidation des Komplexes durch das Nitroxid jedoch Superoxid bzw. durch dessen Disproportionierung freies H_2O_2 gebildet würde, ist ein solcher Mechanismus weniger wahrscheinlich. Die Reaktionen (1) und (2) bieten demgegenüber eine Möglichkeit, die vollständige Reduktion von Sauerstoff in situ und damit den fehlenden Einfluß von Katalase und Superoxid-Dismutase zu erklären.

Da für die Reaktion von N-OH-4ClAA mit HbO_2 eine Kinetik 2. Ordnung gefunden wurde (Sterzl, 1984), wird angenommen, daß

die Oxidation der Hydroxamsäure zum Nitroxid der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist. Die Regenerierung der Hydroxamsäure bei gleichzeitiger Oxidation von Hämoglobin muß daher schneller als die Bildung des Nitroxids erfolgen, weshalb dessen stationäre Konzentration vermutlich sehr niedrig ist. Damit wird verständlich, daß das Nitroxid nicht direkt mit Hilfe der ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte. Aus der Folge der Zyklen (1) und (2) resultiert formal für die Oxidation von einem Äquivalent HbFe^{2+} eine Reduktion von $\frac{1}{3}$ mol O_2 , was in Einklang mit der beobachteten O_2 -Freisetzung in der Anfangsphase der HbO_2 -Oxidation steht. Bei der wesentlich langsameren Hämoglobin-Oxidation durch N-Hydroxy-acetanilid (Abb. 21) war dieses Verhältnis über einen längeren Zeitraum konstant. Im Falle von N-OH-4ClAA nahm die (auf HbFe^{3+} bezogene) Sauerstoffreduktion jedoch rasch zu, was vermutlich durch die erschwerte Oxidation von partiell oxidiertem Hämoglobin bedingt ist. Dieser Effekt ist - neben der Verarmung an HbO_2 - vermutlich für die Verlangsamung der HbFe^{3+} -Bildung am Ende der Reaktion verantwortlich. Seine Ursache ist zur Zeit noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielt die höhere O_2 -Affinität von partiell oxidiertem Hämoglobin eine Rolle, die von Kiese und Schneider (1955) beobachtet wurde.

6. Vergleich der Mechanismen der Ferrihämoglobin-Bildung durch N-Hydroxy-4-chloranilin und N-Hydroxy-4-chloracetanilid

Sowohl N-OH-4ClA als auch sein N-Acetyl-Derivat wird von gereinigtem Oxyhämoglobin in einer gekoppelten Reaktion, d.h. unter gleichzeitiger Bildung von Ferrihämoglobin oxidiert. In beiden Fällen wird der an Hämoglobin gebundene Sauerstoff

reduziert, wobei weder H_2O_2 noch Superoxid als Zwischenprodukte nachweisbar sind. Der initiale Schritt der O_2 -Reduktion bestimmt als langsamste Teilreaktion die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion. Daher folgen beide Kooxidationen einer Kinetik 2. Ordnung (Sterzl, 1984). Beide Verbindungen werden durch HbO_2 sehr viel schneller oxidiert als durch molekularen Sauerstoff. (N-OH-4ClA autooxidiert in Lösung in wenigen Stunden, N-OH-4ClAA innerhalb von Monaten.) Die Aktivierungsenergie der Kooxidation mit HbO_2 , die von Sterzl (1984) bestimmt wurde, beträgt für N-OH-4ClA 3,5 kcal/mol und für N-OH-4ClAA 12,7 kcal/mol. Die Reaktion mit N-OH-4ClA ist daher wesentlich schneller als die mit N-OH-4ClAA.

Obwohl offenbar an beiden Reaktionen Nitroxide beteiligt sind, unterscheiden sich die Mechanismen dennoch grundlegend. Das Arylhydroxylamin wird über die Zwischenstufe des primären Nitroxids irreversibel zum Nitrosoaren oxidiert, wobei weniger als die stöchiometrische Menge Ferrihämoglobin gebildet wird. Im Gegensatz dazu bewirkt die Hydroxamsäure eine katalytische Ferrihämoglobin-Bildung, da das sekundäre Nitroxid durch Hämoglobin wieder zur Hydroxamsäure reduziert wird. Das ist beim primären Nitroxid nicht möglich, da das Halbstufenpotential von N-OH-4ClA/ NO-4ClB (+ 80 mV) niedriger ist als das von $\text{HbFe}^{2+}/\text{HbFe}^{3+}$ (+125 mV). Die Reaktion von N-OH-4ClA mit HbO_2 ist auf Grund der Bildung und des Zerfalls des Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplexes eine wesentlich komplexere Reaktion als die von N-OH-4ClAA, bei der außer HbO_2 und HbFe^{3+} keine weiteren Hämoglobin-Derivate gefunden wurden. Aus der Massenbilanz der Reaktion von N-OH-4ClA mit HbO_2 wurde auf eine rasche kovalente Bindung des Arylhydroxylamins bzw. des Nitrosoarens an das Protein geschlossen. Diese Annahme steht in Einklang mit den Befunden von Kiese und Taeger (1976),

die eine Bindung von ^{14}C -markiertem Phenylhydroxylamin an Hämoglobin beobachteten. Aus Versuchen mit ^{14}C -markiertem N-OH-4ClAA (Sterzl, 1984) ist dagegen bekannt, daß weder die Hydroxamsäure noch eines ihrer Reaktionsprodukte in größerem Umfang an Hämoglobin gebunden wird.

LITERATURVERZEICHNIS

Albert, A. & Serjeant, E. P. (1971)

The Determination of Ionization Constants, p. 44,

Chapman & Hall Ltd, London.

Antonini, E., Wyman, J., Brunori, M., Taylor, J.F.

Rossi-Fanelli, A. & Caputo, A. (1964)

Studies on the oxidation-reduction potentials of heme proteins. I. Human hemoglobin.

J. Biol. Chem. 239, 907 - 911.

Asmus, K.-D. (1984)

Puls Radiolysis Methodology. In: Methods of Enzymology Vol.105,

(Packer, L. ed.), pp. 167 - 178, Academic Press, London.

Aurich, H. G., Hahn, K., Stork, K. & Weiss, W. (1977)

Aminyloxide (Nitroxide) - XXIV. Empirische Ermittlung der Spindichtevertelung in Aminyloxiden.

Tetrahedron 33, 971.

Bamberger, E. (1918)

Acetylierung von β -Phenylhydroxylamin.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 51, 636 - 640.

Bartsch, H., Traut, M. & Hecker, E. (1971)

On the metabolic activation of N-hydroxy-N-2-acetylaminofluorene II. Simultaneous formation of 2-nitrosofluorene and N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene via a free radical intermediate.

Biochim. Biophys. Acta 237, 556 - 566.

Bowman, D. F. Brokenshire, J. L., Gillan, T. & Ingold, K. U.
(1971)

Kinetic Applications of Electron Paramagnetic Resonance
Spectroscopy. II. Self-Reactions of N-Alkyl Nitroxides and
N-Phenyl Nitroxide.

J. Am. Chem. Soc. 93, 6551 - 6561.

Cohen, G. & Hochstein, P. (1963)

Glutathion peroxidase: The primary agent for the elimination
of hydrogen peroxide in erythrocytes.

Biochem. Z. 2, 1420 - 1428.

Dutt, N. K. & Seshadri, T. (1967)

Organic Reagents used in Inorganic Analysis I.

Acid Dissociation Constants of Hydroxamic Acids and N-Aryl-
hydroxamic Acids.

Bull. Chem. Soc. Japan 40, 2280 - 2283.

Eyer, P., Hertle, H., Kiese, M. & Klein, G. (1975)

Kinetics of ferrihemoglobin formation by some reducing agents,
and the role of hydrogen peroxide.

Mol. Pharmacol. 11, 326 - 334.

Fischbach, T. (1975)

N-Hydroxyphenacetin: Darstellung, Biosynthese und Biotrans-
formation

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der
Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Forrester, A. R., Ogilvy, M. M. & Thompson, R. H. (1970)

Mode of action of carcinogenic amines. Part I. Oxidation of N-aryl-hydroxamic acids.

J. Chem. Soc. (C), 1970, 1081 - 1083.

Gattermann, L. & Wieland, T. (1962)

Die Praxis des organischen Chemikers.

Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Goldberg, B. & Stern, A. (1977)

The role of superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte.

Arch. Biochem. Biophys. 178, 218 - 225.

Gotho, T. & Shikama, K. (1976)

Generation of the superoxide radical during autoxidation of oxymyoglobin.

J. Biochem. 80, 397 - 399.

Haworth, R. D. & Lapworth, A. (1921)

Reduction of emulsified nitro-compounds. Part II. Some extensions of the method.

J. Chem. Soc. (London) 119, 768 - 777.

Heubner, W., Meier, R. & Rhode, H. (1923)

Studien über Methämoglobinbildung, V. Mitteilung: Phenylhydroxylamin.

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. 100, 149 - 161.

Heubner, W., Wahler, B. & Ziegler, C. (1953)

Über die Bildung von Hämoglobin durch acylierte Phenylhydroxylamine.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 295, 397 - 403.

Heumann, K. (1872)

Über chlorierte Azoderivate des Benzols.

Ber. Dtsch. Chem. Ges. 5, 910 - 915.

Hildebrandt, A. G., Roots, I., Tjoe, M. & Heinemeyer, G. (1978)

Hydrogen Peroxide in Hepatic Microsomes. In: Methods of Enzymology (Colowick, S. P. & Kaplan, N. O. ed) Vol. LII, 342 - 350, Academic Press, London.

Hustedt, G. & Kiese, M. (1959)

Umsetzungen von Acetanilid und Acetylphenylhydroxylamin im Organismus.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Pathol. u. Pharmakol. 236, 435 - 448.

James, B. R. (1978)

Interaction of dioxygen with metalloporphyrin.

In: The Porphyrins (Dolphin, D., ed.) vol. 5, pp. 205 - 295, Academic Press, London.

Keilin, D. & Hartree, E. F. (1950)

Reaction of Methaemoglobin with Hydrogen Peroxide.

Nature 166, 513 - 514.

Kiese, M. (1974)

Methämoglobinemia : A comprehensive treatise.

CRC Press Inc., Cleveland, Ohio.

Kiese, M. & Reinwein, D. (1950)

Kinetik der Hämoglobinbildung. VIII. Die Oxidation von Hämoglobin durch Phenylhydroxylamin und Sauerstoff.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 211, 392 - 401.

Kiese, M. & v. Ruckteschell, A. (1951)

Kinetik der Hämoglobinbildung. XI. Die katalytische Wirkung des Hämoglobins auf die Oxidation von Phenylhydroxylamin durch Sauerstoff.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 213, 128 - 138.

Kiese, M. & Schneider, C. (1955)

Oxidation von Hämoglobin durch Sauerstoff.

Biochem. Z. 326, 209 - 217.

Kiese, M. & Plattig, K.-H. (1959)

Hämoglobinbildung durch Benzoylphenylhydroxylamin.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 235, 373 - 380.

Kiese, M. & Lenk, W. (1971)

Metabolites of 4-chloroaniline and chloroacetanilides produced by rabbits and pigs.

Biochem. Pharmacol. 20, 379 - 391.

Kiese, M. & Taeger, K. (1976)

The fate of phenylhydroxylamine in human red cells.

Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 292, 59 - 66.

Lenk, W. & Sterzl, H. (1986)

N-Hydroxy-N-arylacetamides II: Molecular aspects of ferrihaemoglobin formation by N-hydroxy-N-arylacetamides and arylhydroxylamines in the rat.

Xenobiotica, 16, 703 - 716.

Misra, H. P. & Fridovich, J. (1972)

The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin.

J. Biol. Chem. 247, 6960 - 6962.

Monzyk, B. & Crumbliss, A. L. (1980)

Acid Dissociation Constants (K_a) and their Temperature Dependencies (H_a , S_a) for a Series of Carbon- and Nitrogen-Substituted Hydroxamic Acids in Aqueous Solution.

J. Org. Chem. 45, 4670 - 4675.

Mulvey, D. & Waters, W. A. (1977)

A Mechanistic Study of the Decomposition of Phenylhydroxylamine to Azoxybenzene and Aniline and its Catalysis by Iron(II) and Iron(III) Ions stabilised by Ethylenediaminetetra-acetic Acid.

J. Chem. Soc. (London), Perkin Transactions II, 1977, 1868 - 1876.

Ogata, Y., Sawaki, Y., Mibae, J. & Morimoto, T. (1964)

Kinetics of the Autoxidation of Phenylhydroxylamines to Azoxybenzenes in Methanol.

J. Am. Chem. Soc. 86, 3854.

Pedersen, C. J. (1957)

Products of the Photochemical Decomposition of N,N'-Disubstituted p-Quinonediimine-N,N'-dioxides.

J. Am. Chem. Soc. 79, 5014 - 5019.

Peisach, J., Blumenberg, W. E., Wittenberg, B. A. &

Wittenberg, J. B. (1968)

The electronic structure of protoheme proteins.

III. Configuration of the heme and its ligands.

J. Biol. Chem. 243, 1871 - 1880.

Poirier, L. A., Miller, J. A. & Miller, E. C. (1963)

The nitrogen- and ring-hydroxylation of 2-acetylaminofluorene and the failure to detect N-acetylation of 2-aminofluorene in the dog.

Cancer Res. 23, 790 - 800.

Riedl, M. (1983)

Das elektrochemische Verhalten von N-Aryl-acetohydroxamsäuren. Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Sterzl, H. (1978)

Darstellung von N-Hydroxy- und kernhydroxylierten Derivaten von 3,4-Dichloranilin und ihre pharmakologische Wirkung.

Diplomarbeit der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Sterzl, H. (1984)

Extrahepatische Aktivierung aromatischer Amine und ihrer Derivate durch Hämoglobin.

Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Umbreit, W. W., Burris, R. H. & Stauffer (1964)

Manometric Techniques (4th ed.), p. 5, Burgess Publishing Company, Minneapolis, Minnesota.

Wallace, W. J., Maxwell, J. C. & Caughey, W. S. (1974)

The mechanism of hemoglobin autoxidation. Evidence for proton-assisted nucleophilic displacement of superoxide by anions.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 1104 - 1110.

Weiss, J. J. (1964)

Nature of iron-oxygen-bond in oxyhaemoglobin.

Nature 202, 83 - 84.

Wever, R., Oudega, B. & Van Gelder, B. F. (1973)

Generation of superoxide radicals during the autoxidation of mammalian oxyhemoglobin.

Biochim. Biophys. Acta 302, 475 -478.

ABKÜRZUNGEN

Hb	Hämoglobin
HbFe ²⁺	Ferrohämoglobin
HbFe ³⁺	Ferrihämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HbFe ²⁺ -Ar-NO	Nitrosoaren-Hämoglobin-Komplex
HbFe ²⁺ -NO-4ClB	4-Chlornitrosobenzol-Hämoglobin-Komplex
HbFe ³⁺ -OOH ⁻	Ferrihämoglobin-H ₂ O ₂ -Komplex
4-ClA	4-Chloranilin
4-ClAA	4-Chloracetanilid
N-OH-AA	N-Hydroxy-acetanilid
N-OH-4ClAA	N-Hydroxy-4-chloracetanilid
N-OH-4EAA	N-Hydroxy-4-ethoxy-acetanilid
N-OH-3,4ClAA	N-Hydroxy-3,4-dichloracetanilid
N-OH-4ClA	N-Hydroxy-4-chloranilin
NO-4ClB	Nitroso-4-chlorbenzol
NO ₂ -4ClB	Nitro-4-chlorbenzol
BAClB	4,4'-Bisazoxychlorbenzol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (high pressure liquid chromatography)

